

Caracterização da acumulação e da tolerância ao stress induzido por Cd em plantas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.)

FILIPA REGO PINTO

ORIENTADORA: Doutora Maria Luísa Louro Martins

COORIENTADOR: Doutor Miguel Pedro Barbosa de Freitas Mourato

TESE ELABORADA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
ENGENHARIA DO AMBIENTE

2017

Caracterização da acumulação e da tolerância ao stresse induzido por Cd em plantas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.)

FILIPA REGO PINTO

ORIENTADORA: Doutora Maria Luísa Louro Martins

COORIENTADOR: Doutor Miguel Pedro Barbosa de Freitas Mourato

TESE ELABORADA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
ENGENHARIA DO AMBIENTE

JÚRI:

Presidente: Doutor António José Guerreiro de Brito. Professor Associado com Agregação,
Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Luísa Dias de Carvalho de Sousa Leonardo. Professora Catedrática,
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa;

Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira. Professora Associada, Universidade de
Aveiro;

Doutor Manuel José de Matos. Professor Coordenador, Instituto Superior de
Engenharia, Instituto Politécnico de Lisboa;

Doutora Maria Luísa Louro Martins. Professora Auxiliar, Instituto Superior de
Agronomia, Universidade de Lisboa;

Doutora Luísa Cristina dos Mártires Ferreira de Carvalho. Bolseira Pós-
doutoramento, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.

Tese financiada pela Fundação para a Ciência e Tecnologia

Com o apoio da unidade de investigação LEAF - Linking, Landscape, Environmental,
Agriculture and Food

2017

Agradecimentos

Estes foram cinco anos de trabalho, de muito trabalho... Trabalho que foi mais fácil, que foi mais rápido, que foi mais divertido, que foi melhor compreendido, graças a todas as pessoas que direta ou indiretamente nele estiveram envolvidas.

Em primeiro lugar eu quero agradecer aos meus queridos Professores Luísa Louro Martins e Miguel Mourato, pois sem eles não teria concorrido à bolsa, não a teria ganho e não realizaria o meu trabalho de doutoramento. Queria agradecer tudo o que me ensinaram (e espero que continuem a ensinar), toda disponibilidade, todo o tempo que despenderam para me ajudar e também todos os momentos divertidos que passámos juntos. Com eles cresci e aprendi muito, não só sobre “stresse oxidativo” e “metais pesados” mas também sobre muitas outras coisas alheias a trabalho. Não tenho palavras para agradecer todo o apoio, paciência, dedicação e amizade.

Em segundo lugar queria agradecer às minhas colegas e amigas Rafaela Reis, Joana Sales, Joana Sengo, Inês Leitão e Inês Moreira.

À minha querida Rafaela Reis que passou para mim o seu saber, as suas dicas e truques do Lab. 17A, que discutiu ensaios comigo e me ajudou em determinações.

À minha amiga Joana Sales, que sempre, sempre, mas mesmo sempre me ajudou, mesmo sem eu pedir qualquer ajuda... Ela estava lá até ao fim, sempre disposta a ajudar, a discutir pormenores de trabalho, a arranjar soluções. Não tenho como agradecer a disponibilidade, as noites e fins-de-semana, despendidos para mim... A verdadeira amizade. Também tornou tudo mais fácil e divertido.

Às meninas de ambiente, Inês Leitão sempre desembaraçada e muito prática, pronta a ajudar, pronta a dar um conselho amigo e uma opinião certa e Joana Sengo companheira e confiante, sempre com um ombrinho disponível.

À Inês Moreira, que tal como Iria Regueiro colegas de doutoramento, a atravessar as mesmas fases, partilharam compreenderam, desabafaram e ouviram desabafos.

A todas pela vossa presença, paciência, disponibilidade e amizade.

A todas as meninas que passaram pelo 17A, nacionais e internacionais, que mais não seja por me terem deixado cantar à vontade. Contudo um obrigada especial a Rebeca Fernández que, mais tarde, me recebeu prontamente em Oviedo.

Ao Daniel Fernández e à Professora Aida Gonzalez, também da Universidade de Biologia de Oviedo, que me receberam e foram incansáveis não só no laboratório como fora deste. Obrigada também aos restantes membros do grupo da unidade, foi muito mais divertido com o café da manhã.

Ao pessoal do laboratório 10, à Dona Lurdes, à Sónia e em especial ao Miguel Martins por toda a ajuda e explicações sobre técnicas de análise aos solos. Ao Professor David Fanguero pela colaboração em alguns ensaios, pelas suas palavras amigas e incentivos. Ao Professor Ernesto Vasconcelos pelos conselhos e “piadolas”, que também fazem falta para animar a malta e à Professora Fernanda Cabral por toda a sua ajuda.

Obrigada Natalina, Paula, Chirstine por todos os bons momentos passados na salinha e ao Felício pela sua pronta ajuda no horto sempre que solicitei.

Ao Doutor António Leitão e Doutora Ana, pelo auxílio, ensinamento na determinação de carotenoides e clorofilas por HPLC, não esquecendo as palavras amigas que souberam transmitir numa fase menos boa da minha vida.

À minha família que sempre foi a base, e que por razões menos boas se tornou muito presente nesta fase final.

Aos meus pais... À minha mãe, eterna guerreira que me obrigava a estudar dando-me o empurrão para hoje chegar até aqui, ao meu pai lutador e sonhador, forte como o aço... que apesar de tudo o que passaram e de tudo o que ainda passamos, sempre me incentivaram e “empurraram para a frente”.

Aos meus manos e toda a família Almeida que nesta fase final foram muito importantes, foram incansáveis. Obrigada pelo vosso esforço e sacrifício meus queridos manos, e obrigada mana velhota pelo teu exemplo.

Ao meu marido, inevitavelmente o meu saco de boxe (não literalmente). Obrigada amor por me ouvires, simplificares, me distraíres e me ajudares nas demais tarefas nesta fase final.

Um muito obrigada a todos vós.

Resumo

A contaminação de produtos hortícolas com metais pesados como o cádmio pode ser um problema ambiental e de saúde pública. O espinafre é um vegetal importante na alimentação, sendo pertinente avaliar o seu comportamento em meios contaminados para prevenir a contaminação da cadeia alimentar.

Neste trabalho, caracterizou-se a acumulação de cádmio e a tolerância da planta de espinafre, através de ensaios em solução nutritiva, utilizando diferentes níveis de contaminação (5 até 100 μM), diferentes tempos de exposição (24 horas até 21 dias) e diferentes estados de desenvolvimento (30 e 70 dias). Foi também feita uma caracterização da acumulação de cádmio nas plantas em solo contaminado.

Este trabalho permitiu verificar que em curtos períodos de exposição (24 horas) e com 40 dias de crescimento, o espinafre acumula elevadas concentrações na raiz, com baixa translocação para a parte aérea. Para tempos de exposição superiores a planta acumula cádmio em folhas com concentrações que ultrapassam o limite máximo legislado de 0,2 mg kg^{-1} de matéria fresca. As plantas expostas a 100 μM de cádmio apresentaram efeitos visíveis de toxicidade apenas a partir do 17º dia de exposição. As folhas de plantas expostas a 25 e 50 μM de cádmio durante 14 dias apresentaram concentrações acima de 100 mg kg^{-1} MS, sem sinais visíveis de toxicidade. Em solos, também se verificou acumulação nas folhas superior ao limite máximo.

Esta capacidade de tolerar elevadas concentrações de cádmio resulta de uma resposta antioxidante global da planta de espinafre, através da atividade enzimática da catalase, guaiacol-peroxidase e ascorbato-peroxidase que atuam na remoção de H_2O_2 em excesso e da glutatona-redutase, responsável pela produção de glutatona fundamental para a produção de fitoquelatinas, que aparenta ser um dos mecanismos essenciais para uma eficaz defesa. A ação de ácidos orgânicos, carotenoides e ascorbato, são também responsáveis pela elevada tolerância da planta.

Palavras-chave: Cádmio, Espinafre, Stresse oxidativo, Resposta antioxidante, Fitoquelatinas.

Abstract

Contamination of vegetables with heavy metals such as cadmium can be an environmental and public health problem. Spinach is an important vegetable in human diet, and thus it is relevant to evaluate its behavior in contaminated media to prevent contamination of the food chain.

In this work, we characterized the accumulation of cadmium and tolerance of spinach plant, through experiments in nutrient solution using different contamination levels (5 to 100 μM), different exposure times (24 hours to 21 days) and different development stages (30 and 70 days). A characterization of cadmium accumulation in plants in contaminated soil was also performed.

This work has shown that in short periods of exposure (24 hours) and 40 days of growth, spinach accumulates high concentrations in the root, with low translocation to the shoots. For greater exposure times, the plant accumulates cadmium in leaves with concentrations exceeding the legislated maximum of 0.2 mg kg^{-1} of fresh matter. The plants exposed to 100 μM cadmium showed visible effects of toxicity only from the 17th day of exposure. The leaves of plants exposed to 25 and 50 μM of cadmium for 14 days showed concentrations above 100 mg kg^{-1} dry matter without visible signs of toxicity. In soils, there was also accumulation in the leaves above the maximum allowed limits.

This ability to tolerate high concentrations of cadmium results from an overall antioxidant response of the spinach plant by the enzymatic activity of catalase, guaiacol-peroxidase and ascorbate-peroxidase, working together in the removal of excess H_2O_2 and glutathione-reductase, responsible for the production of glutathione. This compound is fundamental in the phytochelatin synthesis, which appears to be one of the main defense mechanisms used by spinach. Organic acids, carotenoids and ascorbate, seem to be also responsible for the high tolerance of the plant.

Key-Words: Cadmium, Spinach, Oxidative stress, Antioxidant response, Phytochelatins

Índice

Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	xiv
Lista de Abreviaturas	xvii
Preâmbulo	xix
Objetivos	xxii
Capítulo I – Introdução Geral	1
1.1. Metais Pesados.....	3
1.2. Cádmio.....	6
1.2.1. Disponibilização de Cd.....	9
1.2.2. Absorção de Cd pelas plantas.....	10
1.2.3. Toxicidade de Cd para as plantas	15
1.2.4. Toxicidade de Cd para o Ser Humano	17
1.3. Mecanismos de defesa das plantas ao stresse oxidativo induzido por metais.....	18
1.3.1. Sistema antioxidante enzimático	23
1.3.2. Sistema antioxidante não enzimático	26
1.4. Planta de espinafre	32
Capítulo II – Materiais e Métodos	39
2.1. Produção de plantas	41
2.1.1. Ensaio de curta duração de acumulação de Cd	43
2.1.2. Ensaio de avaliação da capacidade de acumulação de Cd.....	45
2.1.3. Ensaio de resposta metabólica ao efeito tóxico de Cd	47
2.1.4. Ensaio em solo artificialmente contaminado com Cd	48
2.2. Colheita e conservação de amostras	52
2.2.1. Amostras de materiais vegetais	52
2.2.2. Amostras de solo	53
2.3. Determinações analíticas em materiais vegetais.....	53
2.3.1. Determinação da concentração de elementos químicos	53
2.3.2. Determinação de clorofila e carotenoides.....	55
2.3.2.1. Clorofila pelo método não destrutivo <i>Hansatech</i>	55
2.3.2.2. Clorofila pelo método Sims & Gamon.....	56
2.3.2.3. Clorofila e Carotenoides pelo método Lichtenthaler	57
2.3.2.4. Determinação de carotenoides por HPLC	57
2.3.3. Determinação de ascorbato	58

2.3.4.	Determinação da prolina total.....	59
2.3.5.	Determinação de fitoquelatinas e glutathione reduzida (GSH)	60
2.3.6.	Determinação da concentração de ácidos orgânicos	61
2.3.7.	Determinações de atividade enzimática	61
2.3.7.1.	Atividade enzimática da CAT	62
2.3.7.2.	Atividade enzimática da GPOD	63
2.3.7.3.	Atividade enzimática da SOD.....	64
2.3.7.4.	Atividade enzimática da APX	65
2.3.7.5.	Atividade enzimática da GPX.....	66
2.3.7.6.	Atividade enzimática de GR	67
2.3.8.	Determinação da concentração de Peróxido de Hidrogénio	68
2.3.9.	Determinação da Peroxidação Lipídica	69
2.4.	Determinações analíticas em solos	69
2.4.1.	Determinação do pH e condutividade elétrica	69
2.4.2.	Determinação de Elementos Químicos	70
2.4.2.1.	Determinação de elementos totais	70
2.4.2.2.	Concentração de micronutrientes extraíveis.....	70
2.4.2.3.	Concentração de macronutrientes extraíveis	71
2.4.3.	Determinação do carbono orgânico total	71
2.4.4.	Determinação da concentração NPK extraíveis	71
2.4.5.	Caracterização do chorume de bovino	73
2.5.	Tratamento estatístico.....	73
Capítulo III – Ensaio de curta duração de acumulação de Cd.....		75
3.1.	Introdução	77
3.2.	Material e métodos.....	78
3.3.	Resultados e discussão	78
3.4.	Conclusão	86
Capítulo IV – Avaliação da capacidade de acumulação de Cd		89
4.1.	Introdução	91
4.2.	Material e métodos.....	93
4.3.	Resultados e discussão	94
4.3.1	Caracterização da acumulação de Cd nas diferentes partes da planta	94
4.3.2	Avaliação de parâmetros vegetativos de plantas expostas ao Cd	100
4.3.3	Correlação entre os resultados obtidos	113
4.4.	Conclusão	118

Capítulo V – Ensaio de resposta metabólica ao efeito tóxico do Cd	121
5.1. Introdução	123
5.2. Material e métodos	129
5.3. Resultados e Discussão	130
5.3.1. Caracterização da acumulação de Cd	130
5.3.2. Caracterização da concentração em elementos minerais	134
5.3.3. Caracterização do teor em clorofilas	145
5.3.4. Parâmetros indicadores de stresse oxidativo: MDA e H ₂ O ₂	147
5.3.5. Sistema Antioxidante não enzimático	150
5.3.6. Sistema Antioxidante Enzimático	166
5.3.7. Avaliação integrada da resposta da planta de espinafre à toxicidade induzida por Cd	175
5.4. Conclusão	178
Capítulo VI – Ensaio em solo artificialmente contaminado com Cd	181
6.1. Introdução	183
6.2. Materiais e métodos	185
6.3. Resultados e Discussão	185
6.4. Conclusão	197
Capítulo VII – Conclusões	199
7.1. Conclusões Gerais	201
7.2. Perspetivas Futuras	203
Bibliografia	206
Anexos	I

Índice de Figuras

Capítulo I – Introdução Geral

Figura 1.1 - Ciclo Biogeoquímico de elementos vestigiais, destacando o Cd. As setas amarelas representam a disponibilização, as setas vermelhas a entrada na cadeia alimentar. A – exploração antrópica; B – uso de fertilizantes e produtos fitofarmacêuticos. 5

Figura 1.2 - Distribuição de Cd em mg kg⁻¹, na europa. O mapa representa uma previsão das concentrações de referência numa resolução espacial de 5 km (adaptado de European Commission – JRC 2016)..... 8

Figura 1.3 - Representação de possíveis mecanismos moleculares envolvidos na acumulação e transporte de metais de transição em plantas. (a) Entrada na raiz, (b) Mobilização do solo para a planta, (c) absorção e adsorção celular, (d) translocação/ transporte através do xilema, (e) transporte e armazenamento.13

Figura 1.4 - Concentração de Cd na planta em função da concentração de Cd exterior, demonstrando três comportamentos distintos de plantas (adaptado de Prasad, 2004)14

Figura 1.5 - Produção de diferentes ROS por transferência de energia ou redução sequencial univalente do estado fundamental tripleto de oxigénio (adaptado de Apel & Hirt, 2004)19

Figura 1.6 - Vias de eliminação de ROS em tecidos vegetais: a) ciclo água-água, b) ciclo glutathiona-ascorbato, c) ciclo glutathiona-peroxidase e d) atividade individual de enzimas. SOD – superóxido-dismutase; APX – ascorbato-peroxidase; GPOD – guaiacol-peroxidase; CAT – catalase; DHAR – desidroascorbato-redutase; MDHAR – monodesidroascorbato-redutase; GPX – glutathiona-peroxidase; GR – glutathiona-redutase. PS – fotossistema; Fd - ferredoxina; AsA – ascorbato reduzido; MDHA – monodesidroascorbato; DHA – desidroascorbato.....25

Figura 1.7 - Estrutura química da PC2 (duas repetições do dipéptido Y-Glu-Cys com um terminal Gly); Glu – glutamato, Cys – cisteína, Gly – glicina (adaptado de Serrano et al, 2015)28

Figura 1.8 - Estrutura química dos carotenoides (carotenos: α -caroteno e β -caroteno; xantofilas: luteína, zeaxantina, neoxantina, anteroxantina e violaxantina) e a sua unidade fundamental, isopreno.....30

Figura 1.9 - Ilustração de Spinacea oleracea: (a) pé de flores femininas; (b) ramo com inflorescências masculinas; (c) porção da haste de plantas femininas; (d) flor feminina; (e) flor feminina mostrando o ovário; (f) flor masculina; (g) fruto (adaptado de Flora Ibérica, 2016).32

Capítulo II – Material e Métodos

Figura 2.1 - Imagens de instalações do Horto de Química Agrícola do Instituto Superior de Agronomia, estufa exterior (a), camara de crescimento AraLab (b) e a sala de crescimento (c).

.....42

Figura 2.2 - Representação esquemática da fase de germinação, comum a todos os ensaios realizados. (a) hidratação; (b) sementeira; (c) germinação; (d) crescimento prévio à transplantação, o qual é variável com o tipo de ensaio.....42

Figura 2.3 - Representação esquemática do ensaio de curta duração de acumulação de Cd; (a) fase de germinação, durante 15 dias; (b) 25 dias de crescimento em solução nutritiva; (c) e (d) contaminação com 25 e 50 μM de Cd, respetivamente, e tempos de colheita de amostras.

.....44

Figura 2.4 - Representação esquemática do ensaio de avaliação da capacidade de acumulação de Cd. (a) 15 dias para a fase de germinação; (b) 15 dias de crescimento em solução nutritiva; (c) contaminação das amostras das modalidades de crescimento plantas jovens e plantas adultas com 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd.....46

Figura 2.5 - Representação esquemática do ensaio de resposta metabólica ao afeito tóxico de Cd. (a) 15 dias para a fase de germinação; (b) 15 dias de crescimento em solução nutritiva sem contaminação; (c) contaminação das amostras das modalidades de crescimento plantas jovens e plantas adultas, com 25 e 50 μM de Cd.48

Capítulo III – Ensaio de curta duração de acumulação de Cd

Figura 3.1 - Concentração de Cd (mg kg^{-1} MS) em raiz de espinafre com 40 dias de crescimento, ao longo de 24 h de exposição (a) e nas 3 primeiras horas de exposição (b)..79

Figura 3.2 - Concentração de Cd (mg kg^{-1} MS) em pecíolos de espinafre com 40 dias de crescimento, ao longo de 24 h de exposição (a) e nas 3 primeiras horas de exposição (b)..80

Figura 3.3 - Concentração de Cd ($\mu\text{g kg}^{-1}$ MS) em folhas de espinafre com 40 dias de crescimento, ao longo de 24 h de exposição (a) e nas 3 primeiras horas de exposição (b)..81

Figura 3.4 - Imagem de plantas de espinafre com 40 dias de crescimento, expostas a 25 e 50 μM de Cd durante 24 h de exposição. Os valores indicados correspondem às percentagens de Cd nos pecíolos e nas folhas em relação à quantidade na raiz (considerada como 100 %).



.....82

Capítulo IV – Avaliação da capacidade de acumulação de Cd

Figura 4.1 - Concentração de Cd em folhas (a), pecíolos (b) e raízes (c) de plantas jovens ao longo de 21 dias de exposição a concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd. As linhas representam os ajustes à equação (3.1), para cada concentração.....	95
Figura 4.2 - Concentração de Cd em folhas (a), pecíolos (b) e raízes (c) de plantas adultas ao longo de 21 dias de exposição a concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd. As linhas representam os ajustes à equação (3.1), para cada concentração.....	96
Figura 4.3 - Comprimento da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas jovens expostas a 0 (controle), 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd ao longo de 21 dias.	101
Figura 4.4 - Comprimento da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas adultas expostas a 0 (controle), 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd ao longo de 21 dias.	102
Figura 4.5 - Massa da parte aérea (a), da raiz (b) e biomassa total (b) de plantas jovens, expostas a 0 (controle), 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd ao longo de 21 dias.....	104
Figura 4.6 - Massa da parte aérea (a), da raiz (b) e biomassa total (b) de plantas adultas, expostas a 0 (controle), 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd ao longo de 21 dias.....	105
Figura 4.7 - Índice de Tolerância das plantas jovens de espinafre expostas a 0 (controle), 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd, de cada parametro vegetativo e referente a cada dia de exposição.	107
Figura 4.8 - Índice de Tolerância das plantas adultas de espinafre expostas a 0 (controle), 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd, de cada parametro vegetativo e referente a cada dia de exposição.	108
Figura 4.9 - Concentração de clorofilas (em $\mu\text{mol g}^{-1}$) em plantas jovens (a) e plantas adultas (b) expostas a 0 (controle), 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd ao longo de 21 dias.	110
Figura 4.10 - Folhas de plantas jovens expostas a 0 (controle), 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd durante 21 dias.....	111
Figura 4.11 - Raízes de plantas jovens expostas a 0 (controle), 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd durante 21 dias.....	112
Figura 4.12 - Raízes de plantas adultas expostas a 0 (controle), 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd durante 21 dias.....	113

Capítulo V – Ensaio de resposta metabólica ao efeito tóxico do Cd

- Figura 5.1** - Esquema simplificado da produção de carotenoides. GGDP - geranylgeranyl pirofosfato; Ciclo LXL – ciclo luteína epóxido – luteína; Ciclo das xantofilas – ciclo vio-ant-zea VDE - violaxantina-deepoxidase; ZEP - zeaxantina-epoxidase; ABA – ácido abscísico e luteoxantina são produtos da oxidação de carotenoides.127
- Figura 5.2** - Concentração de Cd em folhas de plantas de espinafre jovens (a) e adultas (b) ao longo de 14 dias de exposição a concentrações de 25 e 50 μM de Cd.131
- Figura 5.3** - Concentração de Cd em pecíolos de plantas de espinafre jovens (a) e adultas (b) ao longo de 14 dias de exposição a concentrações de 25 e 50 μM de Cd.132
- Figura 5.4** - Concentração de Cd em raiz de plantas de espinafre jovens (A) e adultas (B) ao longo de 14 dias de exposição a concentrações de 25 e 50 μM de Cd.133
- Figura 5.5** - Concentração de Clorofila a, b e total (a+b) ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF) em folhas de plantas jovens (a) e adultas (b), expostas a 25 μM Cd e 50 μM Cd durante 14 dias.146
- Figura 5.6** - Concentração de H_2O_2 ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF) em plantas jovens (a-folhas, b-raízes) e em plantas adultas (c-folhas e d-raízes) expostas a 0 (controlo), 25 μM Cd e 50 μM Cd, durante 14 dias.148
- Figura 5.7** - Concentração de malondialdeído (MDA) (nmol g^{-1} MF) em folhas e raízes de plantas de espinafre jovens (a-folhas; b-raízes) e adultas (c-folhas; d-raízes), expostas a 0 (controlo), 25 μM Cd e 50 μM Cd durante 14 dias.149
- Figura 5.8** - Concentração de ascorbato reduzido (AsA) e de ascorbato total (AsC) em folhas de plantas jovens (a – AsA e c - AsC) e adultas (b – AsA e d - AsC), expostas a 25 μM Cd e 50 μM Cd durante 14 dias.152
- Figura 5.9** - Concentração de carotenóides totais (mg g^{-1} MF) em folhas de plantas jovens (a) e adultas (b), expostas a 0 (controlo), 25 μM Cd e 50 μM Cd durante 14 dias (método espectrofotométrico).153
- Figura 5.10** - Concentração de Carotenoides totais (mg g^{-1} MF) em folhas de plantas jovens (a) e adultas (b), expostas a 25 μM Cd e 50 μM Cd durante 14 dias (por HPLC).153
- Figura 5.11** - Cromatograma de carotenoides presentes em folhas de espinafre controlo de dia 2. Neo: neoxantina; Vio: violaxantina; Ant: anteroxantina; Zea: zeaxantina; Cl. b: clorofila b; Cl. a: clorofila a; α -car: α -caroteno; β -car: β -caroteno.154

Figura 5.12 - Cromatograma de extratos de folhas controlo (a), 25 μM (b) e 50 μM (c) e raízes controlo (d), 25 μM (e) e 50 μM (f) de plantas de espinafres expostas a 0 (controlo), 25 μM Cd e 50 μM Cd ao 14º dia de contaminação, com indicação dos diferentes tipos de PC detetadas.	161
Figura 5.13 - Cromatograma de extratos de folhas de plantas de espinafres expostas a 50 μM Cd ao 14º dia de contaminação, com os diferentes ácidos orgânicos identificados.	164
Figura 5.14 - Atividade enzimática da CAT ($\text{U g}^{-1} \text{MF}$) em folhas e raízes de plantas de espinafre. Plantas jovens: (a) folhas e (b) raízes. Plantas adultas: (c) folhas e (d) raízes, sem Cd (controlo) e com 25 μM Cd e 50 μM Cd na solução nutritiva.	168
Figura 5.15 - Atividade enzimática da GPOD ($\text{U g}^{-1} \text{MF}$) em folhas e raízes de plantas de espinafre. Plantas jovens: (a) folhas e (b) raízes. Plantas adultas: (c) folhas e (d) raízes, sem Cd (controlo) e com 25 μM Cd e 50 μM Cd na solução nutritiva.	169
Figura 5.16 - Atividade enzimática da APX ($\text{U g}^{-1} \text{MF}$) em folhas e raízes de plantas de espinafre. Plantas jovens: (a) folhas e (b) raízes. Plantas adultas: (c) folhas e (d) raízes, sem Cd (controlo) e com 25 μM Cd e 50 μM Cd na solução nutritiva.	170
Figura 5.17 - Atividade enzimática da SOD ($\text{U g}^{-1} \text{MF}$) em folhas e raízes de plantas de espinafre. Plantas jovens: (a) folhas e (b) raízes. Plantas adultas: (c) folhas e (d) raízes, sem Cd (controlo) e com 25 μM Cd e 50 μM Cd na solução nutritiva.	172
Figura 5.18 - Atividade enzimática da GR ($\text{U g}^{-1} \text{MF}$) em folhas e raízes de plantas de espinafre. Plantas jovens: (a) folhas e (b) raízes. Plantas adultas: (c) folhas e (d) raízes, sem Cd (controlo) e com 25 μM Cd e 50 μM Cd na solução nutritiva.	173
Figura 5.19 - Atividade enzimática da GPX ($\text{U g}^{-1} \text{MF}$) em folhas e raízes de plantas de espinafre. Plantas jovens: (a) folhas e (b) raízes. Plantas adultas: (c) folhas e (d) raízes, sem Cd (controlo) e com 25 μM Cd e 50 μM Cd na solução nutritiva.	174
Figura 5.20 - Esquema metabólico da resposta antioxidante em folhas de planta de espinafre exposta a Cd. A vermelho, estão representados compostos ou reações prejudiciais para a célula; a verde mecanismos de defesa ativos; a cinza mecanismos de defesa ou reações inativas; a imagem de espinafre  representa mecanismos determinados e quantificados apenas em plantas adultas.	177
Figura 5.21 - Esquema metabólico da resposta antioxidante em raízes de planta de espinafre exposta a Cd. A vermelho, estão representados compostos ou reações prejudiciais para a célula; a verde mecanismos de defesa ativos; a cinza mecanismos de defesa ou reações inativas; a imagem de espinafre  representa mecanismos determinados e quantificados apenas em plantas adultas.	177

Capítulo VI – Ensaio em solo artificialmente contaminado com Cd

Figura 6.1 - Biomassa da parte aérea de plantas de espinafre 70 dias após a germinação.	188
Figura 6.2 - Concentração de Cd em folhas (a), pecíolos (b) e raízes (c) de plantas de espinafre expostas a 2 mg kg ⁻¹ e 10 mg kg ⁻¹ de Cd, com diferentes níveis de CB (0 % - controlo, 2,5 %, 5 % e 10 %) durante 35 dias.	189
Figura 6.3 - Percentagem de Cd em cada parte da planta (folhas, pecíolos e raiz) em função do tratamento com CB para 2 mg kg ⁻¹ (a) e 10 mg kg ⁻¹ (b).	191
Figura 6.4 - Índice de tolerância ao Cd calculado em função da biomassa obtida.	196
Figura 6.5 - Registo fotográfico de plantas de espinafre do Ensaio em solo artificialmente contaminado com Cd, ao sexagésimo dia de ensaio.	197

Anexos

Figura A1 - Imagens do ensaio do capítulo IV, plantas jovens ao 6º dia de exposição (régua ≈ 40 cm).	II
Figura A2 - Imagens do ensaio do capítulo IV, plantas jovens ao 21º dia de exposição (régua ≈ 60 cm, para 0 e 5 µM Cd; ≈50 cm para 10, 25 e 50 µM Cd; ≈40 cm para 100 µM Cd).	III
Figura A3 - Imagens do ensaio do capítulo IV, plantas adultas ao 6º dia de exposição (régua ≈ 50 cm).	IV
Figura A4 - Imagens do ensaio do capítulo IV, plantas adultas ao 21º dia de exposição (régua ≈ 50 cm).	V

Índice de Tabelas

Capítulo I – Introdução Geral

Tabela 1.1 - Densidade, massa atômica e número atômico de elementos metálicos considerados por vários autores como metais pesados, e potenciais poluentes (Greenwood & Earnshaw, 2005).	4
Tabela 1.2 - Percentagens e massa atômica de isótopos estáveis de Cd (adaptado de WebElements, 2016).	7
Tabela 1.3 - Teores máximos de Cd admissíveis pela legislação em vigor.	11
Tabela 1.4 - Níveis de nutrientes considerados adequados na análise foliar 30 dias após sementeira, expressos em percentagem (%) ou partes por milhão (ppm) (Almeida, 2006). .	34
Tabela 1.5 - Composição nutricional média da planta de espinafre, por 100 g de parte comestível (adaptado de Almeida, 2006).	37

Capítulo II – Material e Métodos

Tabela 2.1 - Composição da solução nutritiva (solução Hoagland modificada) com as respectivas concentrações de cada nutriente.	43
Tabela 2.2 - Análise elementar do solo primário (areia) .utilizado neste ensaio.	49
Tabela 2.3 - Quadro resumo com detalhes do delineamento experimental de cada ensaio de produção de plantas.	51
Tabela 2.4 - Condições experimentais da câmara de grafite do espectrofotômetro de absorção atômica. RD – Leitura; TC – Controlo de temperatura.	54

Capítulo III – Ensaio de curta duração de acumulação de Cd

Tabela 3.1 - Parâmetros da equação (3.1) ajustada à acumulação de Cd nas diferentes partes da planta.	83
---	-----------

Capítulo IV – Avaliação da capacidade de acumulação de Cd

Tabela 4.1 - Parâmetros da equação (3.1) ajustada à acumulação de Cd nas diferentes partes de plantas jovens, correspondem às linhas dos gráficos da figura 4.1.	97
Tabela 4.2 - Parâmetros da equação (3.1) ajustada à acumulação de Cd nas diferentes partes de plantas adultas, correspondem às linhas dos gráficos da figura 4.2.	97
Tabela 4.3 - Número médio de folhas de plantas colhidas em cada dia de ensaio.....	109
Tabela 4.4 - Coeficientes de correlação de Pearson, correlações mais relevantes entre parâmetros vegetativos em função da concentração, para cada dia de ensaio.	114
Tabela 4.5 - Coeficientes de correlação de Pearson, correlações mais relevantes entre parâmetros vegetativos em função do tempo, para cada concentração de Cd na solução nutritiva.	114

Capítulo V – Ensaio de resposta metabólica ao efeito tóxico do Cd

Tabela 5. 1 - Concentração de elementos químicos Ca, Mg, K (g kg^{-1} MS) e Fe, Zn, Cu, Mn (mg kg^{-1} MS) em folhas de plantas de espinafre expostas a 0 (controlo), 25 μM Cd e 50 μM Cd, durante 14 dias.	136
Tabela 5. 2 - Concentração de elementos químicos Ca, Mg, K (g kg^{-1} MS) e Fe, Zn, Cu, Mn (mg kg^{-1} MS) em pecíolos de plantas de espinafre expostas a 0 (controlo), 25 μM Cd e 50 μM Cd durante 14 dias.	137
Tabela 5. 3 - Concentração de elementos químicos Ca, Mg, K, Fe, Zn, (g kg^{-1} MS) e Cu, Mn (mg kg^{-1} MS) em raiz de plantas de espinafre expostas a 0 (controlo), 25 μM Cd e 50 μM Cd durante 14 dias.....	138
Tabela 5.4 - Tabela resumo de resultados de elementos determinados por EAA, representados nas tabelas 5.1, 5.2 e 5.3.....	144
Tabela 5.5 - Coeficiente de correlação de Pearson entre a concentração de cada elemento e a concentração de Cd nas diferentes partes da planta, ao longo do tempo.....	144
Tabela 5.6 - Coeficientes de correlação de Pearson entre a concentração de Cd em folhas e raízes e os parâmetros indicadores da extensão de stresse oxidativo, ao longo do tempo.	150
Tabela 5. 7 - Concentração de carotenoides ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF) em folhas de espinafre expostas a 0 (controlo), 25 μM Cd e 50 μM Cd durante 14 dias.	156

Tabela 5. 8 - Concentração de PC e GSH (nmol GSH g ⁻¹ MF) em folhas de plantas de espinafre adultas, expostas a 0 (controle), 25 µM Cd and 50 µM Cd durante 14 dias.	158
Tabela 5. 9 - Concentração de PCs e GSH (nmol GSH g ⁻¹ MF) em raiz de plantas de espinafre adultas, expostas a 0 (controle), 25 µM Cd and 50 µM Cd durante 14 dias.	158
Tabela 5.10 - Estrutura de cada fitoquelatina detetada por HPLC, neste estudo (baseado em Oven et al., 2002, Prasad, 2004 e Serrano et al., 2015).	159
Tabela 5. 11 - Concentração de ácidos orgânicos (µmol g ⁻¹ MF) em folhas de plantas de espinafre adultas, expostas a 0 (controle), 25 µM Cd and 50 µM Cd durante 14 dias.	163
Tabela 5. 12 - Concentração de ácidos orgânicos (µmol g ⁻¹ MF) em raiz de plantas espinafre adultas, expostas a 0 (controle), 25 µM Cd and 50 µM Cd durante 14 dias.	163
Tabela 5.13 - Coeficientes de correlação de Pearson entre a concentração de Cd nos tecidos e parâmetros indicadores da extensão de stresse oxidativo, e o sistema antioxidante não enzimático, ao longo do tempo para plantas adultas.	165
Tabela 5.14 - Coeficientes de correlação de Pearson entre a concentração de Cd nos tecidos e parâmetros indicadores da extensão de stresse oxidativo, e o sistema antioxidante não enzimático, ao longo do tempo para plantas jovens.	166

Capítulo VI – Ensaio em solo artificialmente contaminado com Cd

Tabela 6.1 - Características principais do chorume de bovino (CB) utilizado (valor ± desvio padrão) (n=3).	186
Tabela 6.2 - Características principais do solo para cada condição experimental. As barras de erro correspondem ao desvio padrão e o asterisco indica diferenças significativas (p <0,05) entre o controle (0 % CB) (n = 3).	187
Tabela 6. 3 - Concentração de elementos em folhas (F), pecíolos (P) e raízes (R) de plantas de espinafre para cada tratamento experimental por massa seca.	193

Anexos

Tabela A1 - Curva de calibração para cada elemento determinado por EAA em chama, padrões em mg L ⁻¹ , ou em grafite. Alguns padrões necessitam da adição de interferentes de cloreto de estrôncio (SrCl ₂) ou de cloreto de cério (CsCl ₂).	I
--	----------

Lista de Abreviaturas

ABA - ácido abscísico	GPX – glutational-peroxidase
ADN – ácido desoxirribonucleico	GR – glutational-redutase
AF – ácidos fúlvicos	GSH – glutational reduzida
AGPI – ácidos gordos polinsaturados	GSSG – glutational oxidada
Ant – anteroxantina	HA – ácidos húmicos
AO – ácidos orgânicos	HMAAs – <i>heavy metals transporting ATPases</i>
APX – ascorbato-peroxidase	HPLC – <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ARN – ácido ribonucleico	IARC – <i>Internacional Agency for Research Cancer</i>
AsA – ascorbato reduzido	LM – limite máximo
AsC – ascorbato total	Lut – luteína
ATP – adenosina trifosfato	LXL – luteína epóxido - luteína
Car – carotenoides	MDA – malondialdeído
CAT – catalase	MDHA – monodesidroascorbato
CB – chorume bovino	MDHAR – monodesidroascorbato-redutase
CMA – concentração máxima admissível	MF – matéria fresca
DHA – desidroascorbato	MO – matéria orgânica
DHAR – desidroascorbato-redutase	MS – matéria seca
DP – desvio padrão	MT – metalotioneínas
EAA – espectrofotometria de absorção atômica	n.a. – não aplicável
EAM – espectrofotometria de absorção molecular	NADP ⁺ - nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidada
EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético	NADPH – nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reduzida
FC – fotómetro de chama	Neo – neoxantina
HNE – 4-hidroxi-2-nonenal	NPT – tiois não proteicos
GGDP – geranilgeranil pirofosfato	
GPOD – guaiacol-peroxidase	

NRAMP – *natural resistance – associated macrophage proteins*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PC – fitoquelatinas

PFHP – produtos farmacêuticos e de higiene pessoal

PSI – fotossistema I

PSII – fotossistema II

ROS – *Reactive oxygen species*

SH – grupo tiol

TBA – ácido tiobarbitúrico

TCA – ácido tricloroacético

TOC – *total organic carbon*

VAZ – violoxantina-antioxantina-zeaxantina

VDE – violaxantina-deepoxidase

VI – valor indicativo

Vio – violoxantina

VMA – valor máximo admissível

Zea – zeaxantina

ZEP – zeaxantina-epoxidase

ZIP- IRT1 – *zinc-regulated transporter/iron-regulated transporter*

Preâmbulo

Este trabalho foi possível devido a uma bolsa de doutoramento da FCT (SFRH/BD/81080/2011), e teve também o apoio da unidade de investigação LEAF - Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem, pertencente ao Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa (ISA-UL).

Os trabalhos apresentados nesta tese resultaram de ensaios desenvolvidos na sua grande maioria no ISA-UL. Em alguns destes ensaios e pela especificidade das técnicas analíticas, algumas determinações foram realizadas no Departamento de Biologia de Organismos e Sistemas da Universidade de Oviedo, e nas instalações do antigo Instituto de Investigação Científica Tropical (IICT) em Oeiras.

A presente tese foi preparada e organizada tendo em conta a realização de diferentes ensaios que correspondem aos capítulos III, IV, V e VI. Como resultado destes ensaios foram apresentadas algumas comunicações orais e em painel, em conferências nacionais e internacionais, bem como um artigo numa revista internacional referenciada no *Web of Knowledge*.

No **Capítulo I** é apresentada uma introdução ao trabalho com o estado da arte e o respetivo enquadramento científico, que justificaram o tema do doutoramento e a sequência dos trabalhos realizados e apresentados.

O **Capítulo II** é constituído pela caracterização do desenvolvimento experimental do trabalho, descrição das condições em que decorreram os ensaios e o delineamento experimental aplicado, bem como uma descrição das metodologias analíticas utilizadas.

O **Capítulo III** consistiu na caracterização do processo de acumulação de Cd pela planta de espinafre ao longo do tempo, durante 24 horas, como forma de compreensão de uma resposta da planta para tempos curtos de exposição à contaminação. Foram utilizadas concentrações de Cd de 25 e 50 μM .

O **Capítulo IV** surge na sequência do capítulo anterior e permitiu avaliar essa resposta da planta ao efeito do Cd, caracterizando a sua capacidade de absorção e acumulação deste metal, através da monitorização dos parâmetros de crescimento, para diferentes concentrações de Cd (5, 10, 25, 50 e 100 μM) e em diferentes tempos de exposição (2, 6, 13, 17, 21 dias). Foram também utilizadas plantas em duas fases de desenvolvimento distintas, com o objetivo de comparar o comportamento da planta quando a contaminação surge numa

fase precoce de desenvolvimento (em plantas jovens) ou numa fase mais avançada (em plantas adultas).

Através dos resultados obtidos do ensaio descrito no capítulo IV foi planeado o ensaio seguinte, que se encontra descrito no **Capítulo V**, dado que permitiu estabelecer as condições adequadas de contaminação para os objetivos desse ensaio.

Assim, no **Capítulo V** foi estudada a resposta metabólica da planta de espinafre, em plantas contaminadas com 25 e 50 μM de Cd, e com tempos de exposição até 17 dias. Os objetivos deste ensaio são uma caracterização global e integradora dos mecanismos de defesa contra o stresse oxidativo e as estratégias antioxidantes que permitem que esta planta seja considerada como uma planta acumuladora. Para isso, foi verificado se o Cd interfere no metabolismo da planta, que mecanismos de defesa são ativos na presença de Cd e que mecanismos a planta desenvolve para que a presença de um metal tóxico como o Cd nos tecidos não desencadeie efeitos visíveis. O **Capítulo V** permitiu assim aumentar o conhecimento científico relativo aos mecanismos de defesa do espinafre quando exposto a Cd.

O **Capítulo VI** descreve um ensaio realizado em solo artificialmente contaminado com Cd, para explorar condições de crescimento diferentes das utilizadas nos ensaios anteriores (em solução nutritiva), dados que estas influenciam a disponibilidade do Cd para a planta. Pretendeu-se também avaliar o efeito da aplicação de matéria orgânica na eventual redução da toxicidade do Cd.

Em cada um dos capítulos relativos aos ensaios, é feita uma introdução ao tema em estudo, uma breve descrição da metodologia experimental específica e a apresentação e discussão de resultados.

Estes capítulos permitiram definir a capacidade de acumulação de Cd da planta de espinafre e identificar as respostas metabólicas inerentes a esta capacidade. Contudo tal como em qualquer trabalho científico, também esta tese abre horizontes a outras questões, que são abordadas no último capítulo da tese.

As publicações que resultaram do trabalho apresentado nesta tese encontram-se descritas cronologicamente em baixo:

2012	<p>Painel: <u>Pinto, F.R.</u>; Reis, R.A.; Mourato, M.P.; Martins, L.L. (2012) Abiotic Stress Response Induced by Cadmium in Spinach Plants. Plant Abiotic Stress Tolerance II Conference, Viena, Austria, 22-25 Fevereiro 2012.</p>
2013	<p>Painel: <u>Pinto, F.R.</u>; Sales, J.R.; Moreira, I.N.; Mourato, M.P.; Martins, L.L. (2013) Response of spinach (<i>Spinacea oleracea</i>) to cadmium-induced oxidative stress. XIII Congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal, Lisboa, Portugal, 24-28 Julho 2013.</p>
2015	<p>Painel: <u>Pinto, F. R.</u>, Mourato, M. P., Sales, J., Moreira, I. N., Fangueiro, D., Martins, L. L. (2015) Effect of cattle slurry in Cd absorption by spinach plants in contaminated soils. O Solo na Investigação Científica em Portugal. Lisboa, Portugal, 27 Novembro.</p> <p>Artigo em ata de conferência: <u>Pinto, F. R.</u>, Mourato, M. P., Sales, J., Moreira, I. N., Fangueiro, D., Martins, L. L. (2015) “Effect of cattle slurry in cadmium absorption by spinach plants in artificially contaminated soils.” In Abreu, M.M.; Fangueiro, D.; Santos, E.S. Comemorações do Ano Internacional dos Solos. O Solo na Investigação Científica em Portugal. Lisboa (Portugal), ISBN 978-972-8669-65-2, pp. 127-130.</p> <p>Oral: <u>Pinto, F.R.</u>; Sales, J.R.; Gonzales, A.; Mourato, M.P.; Martins, L.L. (2015) Cd induces enzymatic response and phytochelatin synthesis in <i>Spinacea oleracea</i> plants. XIV Congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal, Toledo, Espanha, 13-17 Julho.</p>
2016	<p>Artigo Revista Internacional: <u>Pinto, F.</u>; Mourato, M.; Sales, J.; Moreira, I.; Martins, L. (2015) Oxidative stress response in Spinach plants induced by Cadmium. Journal Plant Nutrition (aceite para publicação).</p> <p>Painel: <u>Pinto, F. R.</u>, Sales, J., Leitão, I., Mourato, M. P., Martins, L. L. (2016) Cd induces antioxidant enzymatic response and phytochelatin synthesis in <i>Spinacea oleracea</i> plants. Ciência Viva 2016. Lisboa, Portugal, 4-6 Julho.</p> <p>Artigo Revista Nacional: Moreira, I.N., Pacheco, J., <u>Pinto, F.R.</u>, Sales, J., Leitão, I., Martins, L.L., Mourato, M.P. (2016) Agricultura urbana e ambiente: contaminação por metais pesados de plantas alimentares. Revista Agros, nº1, pag 32-41, AEISA, Portugal (<i>sem referee</i>).</p>

Objetivos

A contaminação de produtos hortícolas com metais pesados surge principalmente devido à contaminação do ar, solos e águas de rega em resultado de diferentes atividades antropogénicas. Esta é uma temática de elevado interesse prático e transversal a diversas áreas científicas, sendo simultaneamente um problema ambiental (ar, solos e águas), agroalimentar (produção de culturas alimentares contaminadas) e de saúde pública (contaminação do Homem pela cadeia alimentar).

É assim de extrema importância compreender o efeito destes metais no crescimento de várias espécies vegetais e identificar as espécies capazes de acumular elevadas quantidades desses contaminantes não só para a utilização em processos de fitorremediação, mas também numa perspetiva de proteção do consumidor, quando se utilizam plantas alimentares.

O espinafre é um vegetal que apresenta um elevado valor nutritivo e é dos mais consumidos em todo o mundo, sendo fácil de preparar, podendo ser consumido em fresco ou processado, e é cultivado quer em explorações agrícolas quer em hortas familiares.

Sabendo-se que o Cd provoca stresse oxidativo nas plantas, neste trabalho pretende-se avaliar e quantificar a capacidade de absorção pela planta, a acumulação de Cd nos diferentes órgãos, bem como avaliar esta acumulação em função do momento em que ocorre a contaminação. Isto permitirá clarificar a resposta global da planta ao stresse induzido pela contaminação com o Cd, identificando os mecanismos e as vias metabólicas exatas que permitem ao espinafre manifestar tolerância a este tipo de contaminação.

Capítulo I

Introdução Geral



Capítulo I – Introdução Geral

1.1. Metais Pesados

No ambiente existem vários elementos sob a forma de íons ou moléculas, que se podem encontrar em concentrações ditas normais, deficientes ou excessivas. Quando um desses elementos se encontra fora do seu local habitual ou em concentrações superiores às ditas normais, caso apresente consequências negativas para um organismo, é considerado um poluente (Varennnes, 2003).

Elementos vestigiais são aqueles que normalmente se encontram em concentrações relativamente baixas em solos, plantas ou sistemas aquáticos. Estes podem ser micronutrientes essenciais, como boro (B), manganês (Mn), fluor (F), cobre (Cu), cobalto (Co), molibdénio (Mo), níquel (Ni), selénio (Se) e zinco (Zn), ou elementos sem função biológica conhecida, como alumínio (Al), arsénio (As), cádmio (Cd), mercúrio (Hg), chumbo (Pb) ou crómio (Cr), normalmente associados a problemas de poluição (Varennnes, 2003).

Entre os elementos vestigiais encontramos os metais pesados, assim designados por alguns autores com base em parâmetros como a densidade dos elementos, massa atómica, o número atómico, a toxicidade e outros parâmetros químicos (Agarwal, 2009; Sherameti & Varma, 2010). Por essa razão, a definição de metal pesado não é aceite sem controvérsia, e é necessário ter em conta que a designação de elemento vestigial não é equivalente à designação de metal pesado. Neste trabalho, considerando as opiniões de vários autores, define-se metal pesado como o elemento vestigial metálico, com massa atómica superior a 55, número atómico superior a 23 e densidade superior 5 g cm^{-3} (Varennnes, 2003; DalCorso *et al.*, 2013).

Na tabela 1.1 estão descritos alguns dos metais considerados como metais pesados por vários autores, excluindo à partida os semimetais (por alguns autores designados metalóides) como As. Através dessa tabela é possível verificar que apesar de ser considerado um elemento vestigial, o Al não será considerado um metal pesado neste trabalho, pois não obedece aos parâmetros definidos.



Tabela 1.1 - Densidade, massa atômica e número atômico de elementos metálicos considerados por vários autores como metais pesados, e potenciais poluentes (Greenwood & Earnshaw, 2005).

Elemento metálico	Densidade (g cm ⁻³)	Massa atômica relativa	Nº atômico
Al	2,70	27,0	13
Cd	8,65	112,4	48
Hg	13,55	200,6	80
Pb	11,35	207,2	82
Mn	7,43	54,9	25
Cr	7,19	52,0	24
Cu	8,96	63,7	29
Co	8,90	58,9	27
Mo	10,22	95,9	42
Ni	8,90	58,7	28
Zn	7,87	66,4	30

Os metais pesados são elementos naturais que se encontram em diferentes níveis de fundo nos solos, em locais distintos, consoante o material originário (rocha mãe) que está na sua origem e o respetivo processo de pedogénese (Prasad, 2004; Varennnes, 2003). Estes metais são persistentes no ambiente, não podendo ser eliminados, podem encontrar-se em qualquer compartimento ambiental e ser transferidos entre compartimentos. Entre estes metais, podem-se encontrar elementos com função biológica conhecida, para plantas e/ou para animais, ditos essenciais, e elementos sem qualquer função biológica conhecida.

Deste modo, a grande preocupação surge quando os níveis no solo são elevados face aos níveis de fundo ou quando os níveis de metais pesados disponíveis se tornam prejudiciais para um dado organismo (Prasad, 2004). A sua disponibilização pode ocorrer de fontes naturais, tais como a atividade vulcânica e a meteorização de rochas, ou fontes antropogénicas (figura 1.1).

A contaminação do ambiente por metais pesados surge sobretudo no século XX, devido à atividade antrópica. A exploração de depósitos concentrados e confinados a algumas áreas da crosta terrestre, e a extração de metais levou à sua dispersão por áreas consideráveis. Contudo, a contaminação de origem antropogénica não se resume à extração e uso de minérios e combustíveis fósseis mas também à utilização de veículos automóveis e baterias (concentrações de Cd e Zn superiores junto a estradas), à produção e uso de tintas (que continham Pb) e à utilização de fertilizantes e agroquímicos (dependendo do local de extração) (Varennnes, 2003). Atualmente muitas destas origens de contaminação do ambiente por metais tóxicos estão controladas e portanto, são menos preocupantes, mas existem ainda



muitos casos de contaminação ambiental por metais pesados, como por exemplo: minas de Jalta no Norte da Tunísia, contendo elevadas concentrações de Pb, Zn e Cd (Boussen *et al.*, 2013); Suíça, nas montanhas de Jura em “Le Gurnigel”, contendo elevados teores de Cd (Quezada-Hinojosa *et al.*, 2015); diversos locais de Espanha com elevada concentração de metais, como a Galiza (Ni, Zn e Cr), o norte das Astúrias (Pb, Hg, Zn e Ni), Catalunha (Pb, Cu, Ni e Zn), a zona de Almadén no centro da Cidade Real (Pb, Hg, Cu e Zn), o sul do rio Tinto na província de Huelva (Pb, Cu, e Hg), estendendo-se à restante região sul de Andaluzia (Ni, Hg, Cr e Cu) (Fernández-Genito & Duarte, 2015); Em Portugal, junto ao Porto, foram detetados Pb, Zn e, em menor concentração, Cu (Fernández-Genito & Duarte, 2015), na Mina de São Domingos contendo Pb, Cu, e Cd (Alvarenga *et al.*, 2012), nas minas de Aljustrel, Caveira e complexo químico de Estarreja foram encontradas concentrações consideráveis de Cd (em baixos níveis de contaminação $< 0,3 \text{ mg kg}^{-1}$), Zn, Cu e Pb (Rodrigues *et al.*, 2010), além de serem também referidos por outros autores concentrações de Cd de $2,6 \text{ mg kg}^{-1}$, na zona de Aljustrel (Alvarenga *et al.*, 2008).

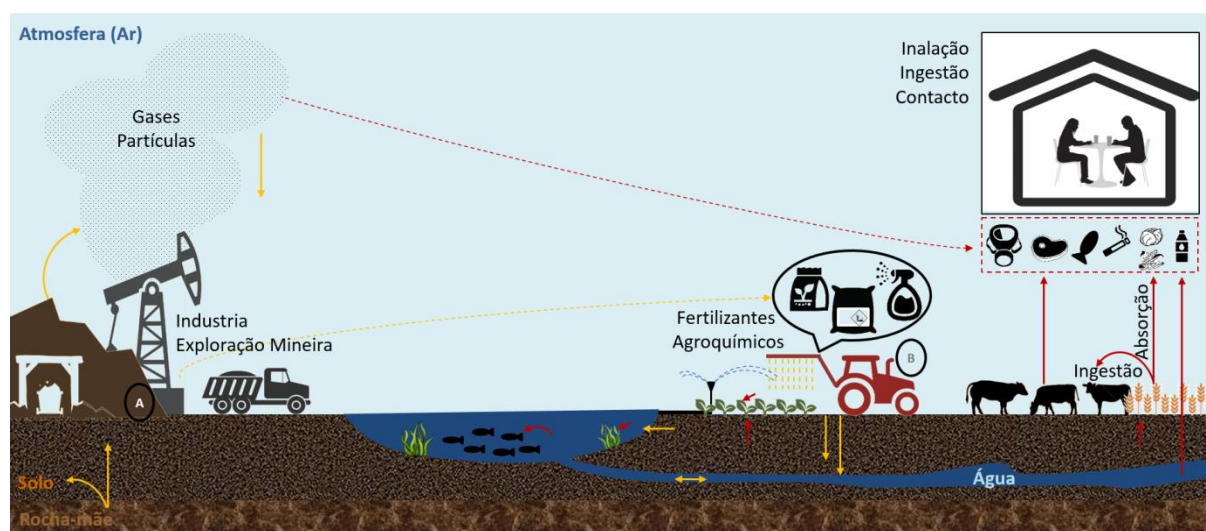


Figura 1.1 - Ciclo Biogeoquímico de elementos vestigiais, destacando o Cd. As setas amarelas representam a disponibilização, as setas vermelhas a entrada na cadeia alimentar. A – exploração antrópica; B – uso de fertilizantes e produtos fitofarmacêuticos.

Tal como a figura 1.1 ilustra, os metais podem ser disponibilizados a partir do material originário quer por deterioração deste, quer por exploração antropogénica (figura 1.1 A). A manipulação (por extração e/ou uso industrial) destes metais também permite a sua dispersão pelo ar, aquíferos e solos por libertação de poeiras, gases e partículas e por descargas de resíduos. O uso de fertilizantes, corretivos (obtidos por extração podendo conter metais como

impurezas), resíduos animais ou vegetais (que já podem conter algum nível de metal) e águas de rega contaminadas também permitem a disponibilização destes no solo (figura 1.1 B). Como consequência, os metais podem ser absorvidos pelas plantas, que, consoante a espécie, apresentarão distintos graus de translocação para os diferentes órgãos. Uma vez nos tecidos vegetais, podem entrar na cadeia alimentar como alimentação direta ou indireta de animais incluindo o ser humano. Não menos importante é a ingestão de água contaminada e a respiração de partículas e gases contaminados com metais.

Contudo, a biodisponibilidade destes metais no solo, para as plantas, depende de várias características do solo tais como: a reação do solo (que depende do pH); a concentração de materiais argilosos, compostos de ferro (Fe), Al, magnésio (Mg), Zn ou Mn; a capacidade de troca iónica; o teor de matéria orgânica; a presença de outros elementos; o potencial redox e a metilação por microrganismos (Prasad, 2004; Varennes, 2003). Além das características do solo, deve-se também ter em conta as características de cada metal e da planta.

A poluição de solos por contaminação química, como são exemplo os metais pesados, pode implicar: menores produções agrícolas para uma população cada vez maior; contaminação de outros compartimentos ambientais (água, ar, biota) e a produção de produtos contaminados, provocando riscos e impactos adversos na saúde humana.

1.2. Cádmio

O Cd é um metal pouco frequente na crosta terrestre, encontrando-se em quantidades vestigiais na maioria dos solos. É um metal uniformemente distribuído nas rochas mais abundantes da crosta terrestre, estimando-se que 900 ton de rocha contenham apenas 200 g de Cd (Mendes & Oliveira, 2004; Cobb, 2008). Segundo Mendes & Oliveira (2004) a distribuição de cádmio pelos compartimentos da ecossfera é cerca de $2,36 \times 10^{15}$ kg na crosta terrestre, $1,32 \times 10^{11}$ kg nos oceanos e $9,20 \times 10^7$ kg em plantas.

O principal minério de Cd é a *greenockita* ou grinoquite, que é composto por sulfureto de cádmio (CdS). Este mineral é muitas vezes encontrado misturado com esfalerite, composta por sulfureto de zinco (ZnS). O Cd nunca se encontra na sua forma pura, ocorrendo ligado a outros elementos sob a forma de sulfato de cádmio (CdSO₄) e cloreto de cádmio (CdCl₂), como os dois mais frequentes (Mendes & Oliveira, 2004; Cobb, 2008; Choppala *et al.*, 2014).

O Cd foi descoberto no século XIX, pelo cientista alemão Friedrich Stromeyer, que encontrou Cd como uma impureza de carbonato de zinco (ZnCO₃) também conhecido como calamina,



substância utilizada nessa altura pelas suas propriedades medicinais. Ao extrair as impurezas, descobriu um metal semelhante ao Zn, ao qual denominou cádmio derivado do latim *cadmia* que significa calamina (Prasad, 2004; Cobb, 2008).

É um metal de transição do grupo 12 e do segundo período da tabela periódica consistindo numa mistura de oito isótopos estáveis (tabela 1.2) e de 34 isótopos instáveis (Mendes & Oliveira, 2004). Atualmente, não se conhece qualquer função biológica deste metal, que se tem demonstrado tóxico para os organismos vivos mesmo em pequenas concentrações. Apresenta uma massa atômica de 112,4 Da e número atômico 48, é sólido à temperatura ambiente com uma densidade de $8,7 \text{ g cm}^{-3}$, sendo por isso considerado, neste trabalho, um metal pesado.

Tabela 1.2 - Percentagens e massa atômica de isótopos estáveis de Cd (adaptado de WebElements, 2016).

Isótopo	¹⁰⁶ Cd	¹⁰⁸ Cd	¹¹⁰ Cd	¹¹¹ Cd	¹¹² Cd	¹¹³ Cd	¹¹⁴ Cd	¹¹⁶ Cd
Abundância na natureza	1,25 %	0,89 %	12,49 %	12,80 %	24,13 %	12,22 %	28,73 %	7,49 %
Massa (Da)	105,9	107,9	109,9	110,9	111,9	112,9	113,9	114,9

O Cd apresenta afinidade moderada para outros elementos, como recetor de eletrões, podendo ser encontrado no solo sob as formas Cd^{2+} , CdSO_4 , CdCl^+ , e na água nas formas Cd^{2+} , carbonato de cádmio (CdCO_3), hidróxido de cádmio (Cd(OH)_2) e CdS (Prasad, 2004; Smolders & Mertens, 2013). Do ponto de vista químico o Cd metálico apresenta baixa solubilidade, mas alguns dos seus sais, nomeadamente cloretos, nitratos e sulfatos são mais solúveis (Mendes & Oliveira, 2004).

Na forma iónica predominante, Cd^{2+} , o Cd apresenta elevada solubiliade, o que o torna um elemento bastante móvel no solo. Contudo esta forma compete com os iões Ca^{2+} e K^+ para a superfície de coloides de argila e coloides orgânicos carregados negativamente. Quanto menor o pH maior a disponibilidade de Cd e consequentemente maior será a competição com outros metais. Deste modo, a disponibilidade de certos nutrientes está dependente dos valores do pH, da concentração de matéria orgânica (como ácidos húmicos e fulvícos), e estes são fatores que interferem na biodisponibilidade de Cd e consequentemente na sua absorção por parte das plantas (Prasad, 2004).

Em solos alagados predomina a forma CdS, menos solúvel, pelo que o Cd se apresenta menos disponível. Por outro lado em solos salinos e ácidos devido à ocorrência de sais de Cd solúveis ou de ião Cd^{2+} , existe maior absorção deste metal por parte das plantas (Varennnes, 2003).

A definição de valores normais de qualquer elemento no solo, ou noutros compartimentos ambientais, é difícil e ambígua, pois estes valores variam de acordo com o material originário e com o processo de pedogénese. Apesar disso, alguns valores de Cd têm sido sugeridos por vários autores como inferiores a $1 - 5 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo e inferiores a 1 mg L^{-1} de água; em solos contaminados encontram-se valores até 30 mg kg^{-1} e até 10 mg L^{-1} em águas (Mendes & Oliveira, 2004; Peralta-Videa *et al.*, 2009).

Em 2008 a *European Soil Data Centre* mapeou a concentração de Cd encontrada em solos europeus, estando representada na figura 1.2.

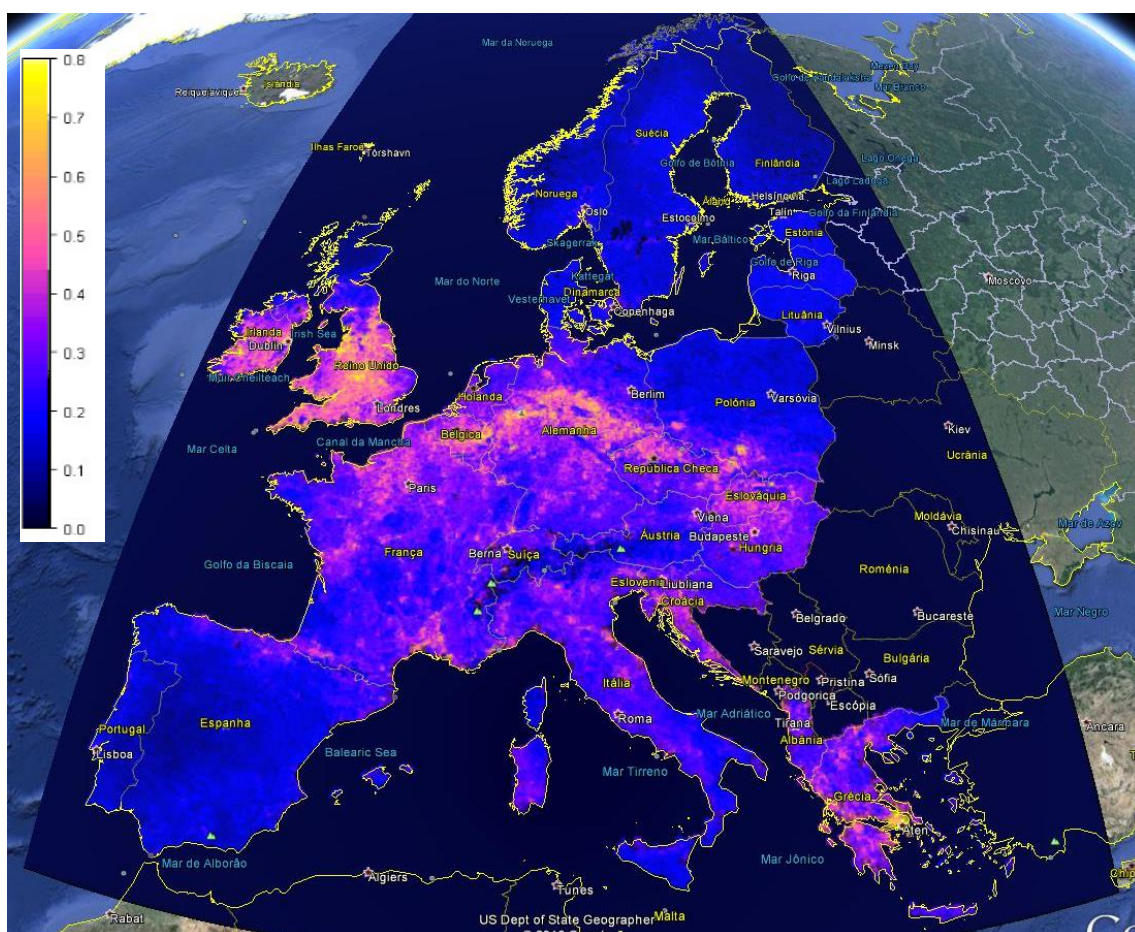


Figura 1.2 - Distribuição de Cd em mg kg^{-1} , na Europa. O mapa representa uma previsão das concentrações de referência numa resolução espacial de 5 km (adaptado de European Commission – JRC 2016).



Pelo mapa é possível verificar que os países com maiores concentrações deste metal são o Reino Unido, Alemanha e Grécia com concentrações até $0,8 \text{ mg kg}^{-1}$, e que Portugal é dos países europeus com menores concentrações (em média, até $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$).

1.2.1. Disponibilização de Cd

O Cd surge primordialmente a partir do material originário, como por exemplo de minérios de grinoquite e esfarelite, e a sua disponibilização para diferentes compartimentos ambientais pode ocorrer por ação da natureza ou por ação antropogénica.

Por ação da natureza correspondem os processos de erosão de rochas com consequente formação de solos, isto é, processos de pedogénese, a atividade vulcânica, a dispersão por ação do vento, bem como outras menos relevantes como fogos florestais e aerossóis marinhos (Varennnes, 2003; Martins *et al.*, 2013).

Por outro lado, as atividades antropogénicas que permitem a sua disponibilização são inúmeras, desde a extração como impureza de minérios até ao uso direto em baterias e pilhas Ni-Cd. Embora a utilização direta deste elemento só tenha ocorrido no século XX, a sua disponibilização começou anteriormente com a extração deste como impureza de minérios não só de Zn e P (em fosforites), mas também de Cu e Pb (Varennnes, 2003, Choppala *et al.*, 2014).

Outras fontes de disponibilização de Cd para o ambiente são a aplicação no solo de biossólidos provenientes de estações de águas residuais, principalmente de origem industrial, que podem apresentar concentrações significativas de metais pesados, a extração e combustão de combustíveis fósseis, o uso de veículos automóveis e de fertilizantes e agroquímicos (Nordberg & Nordberg, 2002; Choppala *et al.*, 2014). O desgaste dos pneus e o Cd como constituinte de combustíveis fazem com que solos junto a estradas apresentem maior concentração deste metal (Varennnes, 2003). Os solos junto a minas, indústrias metalúrgicas e petroquímicas, bem como fundições, estão normalmente contaminados com resíduos e escórias, podendo conter níveis elevados de metais que, por lixiviação, podem contaminar águas superficiais e/ou subterrâneas. As poeiras e sedimentos destas indústrias podem também ser transportados por longas distâncias poluindo o ar, água e até o solo onde se depositem (Nordberg & Nordberg, 2002). A maior via de deposição de Cd no solo é por deposição atmosférica, mas os adubos fosfatados podem contribuir para um décimo da concentração total introduzida. Os teores de Cd em fosforites utilizadas para a preparação de

adubos são muito variáveis, desde 2 mg Cd kg⁻¹ P extraído em minérios de origem vulcânica (da Rússia e África do Sul) até mais de 500 mg Cd kg⁻¹ P extraído de fosforites de origem sedimentar (como as do Senegal) (Varennnes, 2003).

O Cd que é disponibilizado do material originário para outros ambientes pode ou não estar biodisponível para ser absorvido por plantas. A biodisponibilidade depende de vários fatores, já descritos em 1.1.

O Cd é considerado um dos metais pesados com maior fitotoxicidade (DalCorso *et al.*, 2010), dado que não tem função biológica conhecida e pode tornar-se tóxico para plantas quando é absorvido e atinge níveis de 2 a 10 mg kg⁻¹ MS, sendo no entanto estes valores muito variáveis consoante a espécie da planta (White & Brown, 2010; Gallego *et al.*, 2012; Choppala *et al.*, 2014).

Segundo a OMS (2010) valores indicativos de cádmio em água potável são de 3 µg L⁻¹ e para o ar 5 ng m⁻³ (media anual). Os valores máximos de Cd admissíveis em solo, segundo a legislação portuguesa são pouco específicos, referindo-se apenas a solos em que se pretenda aplicar lamas ou outra matéria fertilizante. Segundo a legislação portuguesa (tabela 1.3) para solos onde se pretendam aplicar lamas, o valor de Cd não deve exceder 3 mg kg⁻¹ MS (5,5 < pH ≤ 7) e em solos onde se pretendam adicionar matérias fertilizantes o mesmo valor não deve exceder 1,0 mg kg⁻¹ MS (6 < pH < 7), não existindo qualquer regulamentação para solos onde, por exemplo, simplesmente se produzam culturas alimentares sem qualquer um destes tipos de aplicação.

A legislação Portuguesa em vigor e outras *guidelines*, referentes aos teores de cádmio em águas de consumo humano e rega, em solos onde se pretendam aplicar lamas ou fertilizantes e lamas de uso agrícola e em produtos hortícolas de folha está presente tabela 1.3.

1.1.1. Absorção de Cd pelas plantas

As plantas podem absorver o Cd presente na atmosfera, na água ou no solo. Segundo Prasad (2004) a acumulação de metais não depende apenas da absorção mas também da possível libertação destes para o meio envolvente, destacando as trocas radiculares para plantas terrestres.

**Tabela 1.3** - Teores máximos de Cd admissíveis pela legislação em vigor.

Teor de cádmio		Bibliografia	
Águas destinadas ao consumo humano	5 µg L ⁻¹	VMA VI VMA	Decreto-Lei n.º 236/98 * Diretiva 98/83/CE** OMS
Águas de rega	0,05 mg L ⁻¹	VMA	Decreto-Lei n.º 236/98*
Solos	1mg kg ⁻¹ MS (pH ≤ 5,5)	LM	Decreto-Lei n.º 118/2006
	3 mg kg ⁻¹ MS (5,5 < pH ≤ 7)	LM	
	4mg kg ⁻¹ MS (pH ≥ 7)	LM	
Solos em que se pretenda aplicar matéria fertilizante	0,5 mg kg ⁻¹ MS (5 < pH < 6)	VMA	Decreto-Lei n.º 103/2015
	1,0 mg kg ⁻¹ MS (6 < pH < 7)	VMA	
	1,5 mg kg ⁻¹ MS (pH > 7)	VMA	
Matéria fertilizante com componentes orgânicos	0,7 mg kg ⁻¹ MS (Classe I)	VMA	Decreto-Lei n.º 103/2015
	1,5 mg kg ⁻¹ MS (Classe II)	VMA	
	3,0 mg kg ⁻¹ MS (Classe IIA)	VMA	
	5,0 mg kg ⁻¹ MS (Classe III)	VMA	
Lamas para agricultura	20 mg kg ⁻¹ MS	LM	Decreto-Lei n.º 118/2006
Produtos hortícolas de folha e plantas aromáticas em fresco	0,20 mg kg ⁻¹ MF	LM	Regulamento(CE) n.º 629/2008

*atualizado pelo DL 83/2011, sem alteração do valor paramétrico deste poluente

**alterada pelo DL 306/2007, sem alteração do valor paramétrico deste poluente

VMA – valor máximo admissível

CMA- concentração máxima admissível

VI – valor indicativo

LM – limite/teor máximo

Classe I e II – Uso agrícola

Classe II A – Uso exclusivo em arbóreas e arbustivas

Classe III – Uso em culturas não destinadas a consumo humano

De acordo com Sánita di Toppi & Gabbrielli (1999), a assimilação de cádmio pelas plantas depende não só da sua concentração total no solo mas também da sua biodisponibilidade. De um modo geral, a biodisponibilidade de Cd é menor: quanto maior o pH pela formação de compostos menos solúveis; quanto maior a concentração de colóides e matéria orgânica capaz de o adsorver e também em solos alagados em que ocorre a formação de CdS. Em solos salinos pode existir menor absorção de Cd pelas plantas por formação de CdCl_x ou, por outro lado, pode existir maior absorção de Cd pelas plantas, pela maior disponibilidade da forma Cd²⁺ devido às trocas com o Na normalmente presente em sedimentos (Prasad, 2004; Varennes, 2003).

A absorção de Cd pelas plantas depende não só das condições do meio mas também da cultura em questão; plantas hortícolas como alface e espinafre apresentam maior absorção relativamente a cereais e leguminosas (Alloway, 2004).

A absorção pela raiz pode ocorrer pela zona apical ou através da superfície específica da raiz, e dessa forma ser dependente da capacidade de absorção da planta e também das dimensões da raiz. Quanto maior a área radicular maior será a absorção de Cd, mas se mais do que uma planta crescer nas proximidades pode ocorrer competição na absorção e consequentemente diminuição da eficiência da absorção (Prasad, 2004).

A figura 1.3 é uma representação esquemática dos mecanismos celulares envolvidos na mobilização, absorção, transporte e consequentemente acumulação de metais em plantas.

O metal pode entrar na raiz via apoplasto, isto é, sem entrar no interior das células, uma fração desse metal é transportada para dentro das células, outra parte continua a ser transportada via apoplasto (figura 1.3a), podendo ainda uma fração ficar adsorvida aos materiais constituintes das paredes celulares (Prasad, 2004). A mobilização dos metais do solo para a raiz (figura 1.3b) pode ocorrer por acidificação da rizosfera e/ou liberação de carboxilatos/ácidos orgânicos, que atuam como quelantes formando complexos com metais e permitindo a sua disponibilização e mobilização (Clemens, 2002).

A primeira barreira à entrada de metais pesados são as células (figura 1.3b e c), e a retenção dos metais por ligação às paredes celulares ou a quelantes são considerados mecanismos cruciais para a tolerância a estes metais (Gallego *et al.*, 2012). Contudo o Cd tem a capacidade de entrar nas células através dos sistemas de transporte de elementos essenciais, tais como os iões de cálcio (Ca^{2+}), ferro (Fe^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), Cu^{2+} e Zn^{2+} (Clemens, 2006a; Gallego *et al.*, 2012), pelo que a presença destes elementos pode afetar a absorção de Cd. O transportador ZIP-IRT1 (do inglês *zinc regulated transporter/iron-regulated transporter*) é responsável pelo transporte de Zn, Ni e Fe mas também permite o transporte de Cd (Gallego *et al.*, 2012; Dalcorsó *et al.*, 2014). Outros transportadores transmembranares, também associados ao transporte de Cd são as NRAMP (do inglês *natural resistance - associated macrophage proteins*), responsáveis pelo transporte de elementos essenciais como Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{2+} , mas também transportando Co^{2+} e Ni^{2+} .

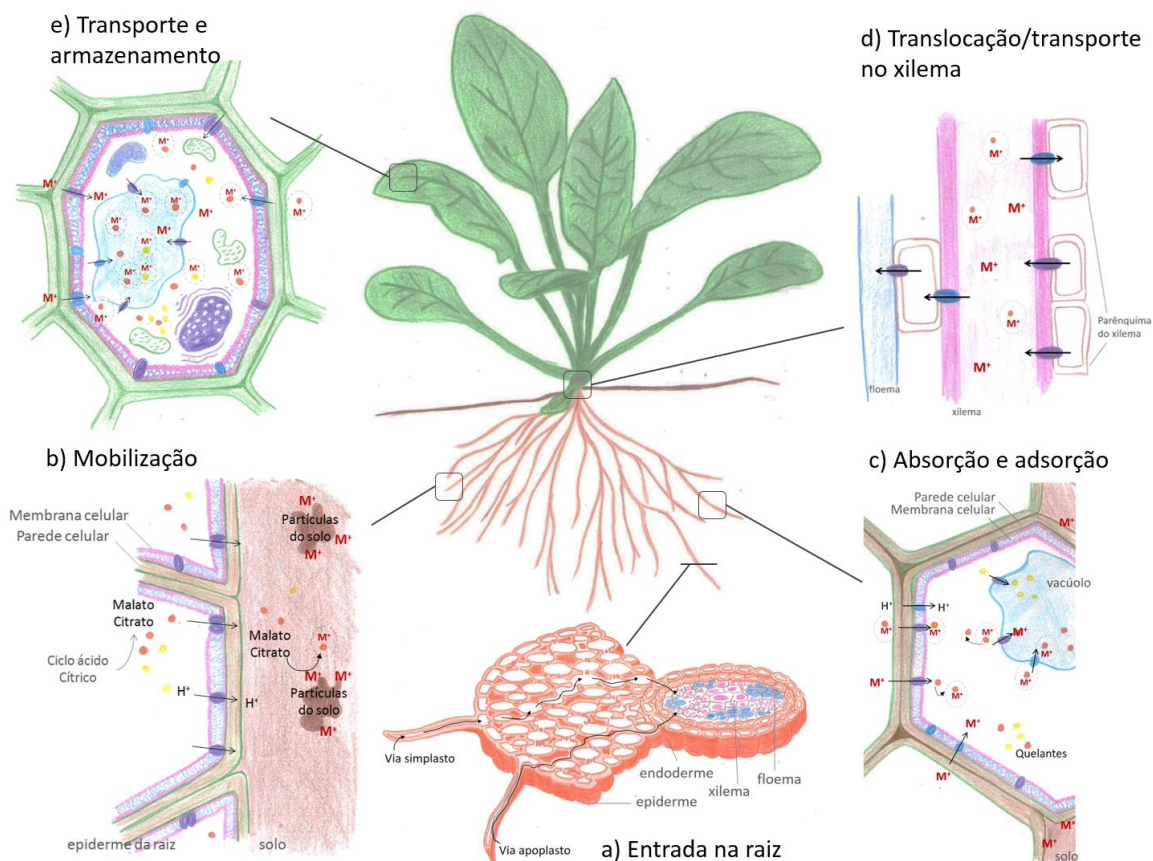


Figura 1.3 - Representação de possíveis mecanismos moleculares envolvidos na acumulação e transporte de metais de transição em plantas. (a) Entrada na raiz, (b) Mobilização do solo para a planta, (c) absorção e adsorção celular, (d) translocação/ transporte através do xilema, (e) transporte e armazenamento.

Em algumas plantas o transporte de Cd pelo xilema é restrito, pois este liga-se largamente às paredes celulares, e por essa razão são geralmente encontradas maiores concentrações em raízes (Martins *et al.*, 2013; Gallego *et al.*, 2012). Por norma a concentração de Cd nos órgãos das plantas diminui de raízes fibrosas para raízes de armazenamento, e sucessivamente para caules e finalmente para as folhas.

O Cd pode alcançar o xilema (figura 1.3d) via apoplasto ou via simplasto (passagem através das células), formando complexos com moléculas solúveis como ácidos orgânicos ou fitoquelatinas, ou apresentando-se sob a forma de iões hidratados (Clemens, 2002). Este metal é transferido via simplasto para o xilema através de transportadores HMAs (do inglês *Heavy Metal Transporting ATPases*) (Clemens, 2002; Gallego *et al.*, 2012). O transporte de metais até às folhas é feito através do xilema e a translocação é promovida pela transpiração das folhas. Pensa-se que os metais são transportados na forma de complexos mas que o Cd seja transportado sob a forma de ião divalente (Prasad, 2004). Gallego *et al.* (2012) refere

que a translocação do Cd é mediada por transportadores de Zn, ZNT1 (pertence ao grupo ZIP-IRT1). O transporte para a parte aérea pode também ser afetado por fatores externos como a presença de EDTA que aumenta a distribuição para a parte aérea (Prasad, 2004).

Segundo Prasad (2004), consoante o potencial que cada planta terá para acumular metais podemos agrupá-las em 4 grupos: indicadoras; exclusoras; acumuladoras e hiperacumuladoras (figura 1.4).

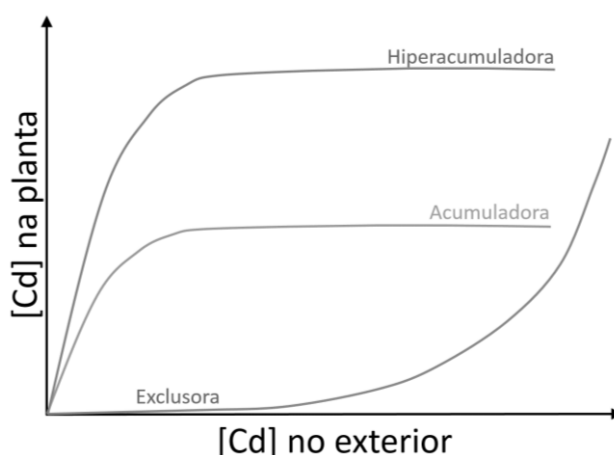


Figura 1.4 - Concentração de Cd na planta em função da concentração de Cd exterior, demonstrando três comportamentos distintos de plantas (adaptado de Prasad, 2004).

As plantas indicadoras são aquelas onde a absorção e o transporte de Cd para a parte aérea é regulado de modo a que a concentração interna se reflète pelo aparecimento de danos exteriores (Peralta-Videa *et al.*, 2009).

Plantas exclusoras são plantas que apresentam baixa absorção do metal, mesmo que as concentrações no exterior sejam elevadas. Estas são plantas que apresentam estratégias (ativas ou passivas) de exclusão que impedem a entrada de Cd, contudo quando expostas a concentrações demasiado elevadas, perdem essa função, provavelmente devido à ação tóxica do metal e a absorção sofre um grande aumento (figura 1.4) (Prasad, 2004). As estratégias que as plantas desenvolvem de modo a evitar a toxicidade do Cd podem, numa primeira fase, ser a libertação de exsudados como o malato (ácido málico) e citrato (ácido cítrico) que permitem ligar os iões à matriz do solo, impedindo a absorção radicular e, numa segunda fase, a ligação dos iões à parede celular e/ou a polissacáridos extracelulares permitindo a sua imobilização e restringindo a absorção para o citosol (DalCorso *et al.*, 2008).



As plantas que acumulam concentrações elevadas de Cd mesmo que as concentrações exteriores sejam baixas, são plantas acumuladoras ou hiperacumuladoras. Estas apresentam mecanismos de destoxificação nos tecidos, que permitem à planta acumular elevadas concentrações de Cd. Quando os níveis exteriores são muito elevados, verifica-se que a planta não tem mais capacidade de absorção, provavelmente devido à competição com outros metais pelos mesmos transportadores (Prasad, 2004). As plantas hiperacumuladoras são, tal como o nome indica, acumuladoras extremas. Normalmente apresentam baixa produção de biomassa pois necessitam da energia para ativar os mecanismos de defesa (Prasad, 2004). Vários autores descrevem as plantas hiperacumuladoras de Cd como plantas que têm capacidade de acumular concentrações superiores a 0,1 mg Cd g⁻¹ MS na parte aérea (Prasad, 2004; Peralta-Videa *et al.*, 2009; Krämer, 2010; Rascio & Navari-Izzo, 2011).

1.1.2. Toxicidade de Cd para as plantas

A toxicidade do Cd é atribuída a diferentes fatores (Sandálio *et al.*, 2001; DalCorso *et al.*, 2010; Mohamed *et al.*, 2012; Choppala *et al.*, 2014), tais como:

- o bloqueio de grupos essenciais de biomoléculas;
- a degradação de lípidos;
- a inibição da atividade enzimática (como a de enzimas responsáveis pela fixação de CO₂, reduzindo a assimilação de carbono);
- a alterações na absorção, transporte e utilização de água e elementos essenciais, alterando a concentração destes nos tecidos;
- o fecho de estomas;
- danos no sistema vascular e no aparelho fotossintético, levando à diminuição da concentração de clorofilas e carotenoides.

A alteração da absorção e balanço de água é associada a alterações morfológicas nas raízes, como diminuição de comprimento, redução de ramificações, desintegração da rizoderme e de outras camadas de células corticais (Hasanuzzaman *et al.*, 2013), mas também pode surgir de alterações nas propriedades da membrana plasmática, que consequentemente levam à diminuição da condutância estomática, da taxa de transpiração, dos teores relativos de água nas folhas e da elasticidade da parede celular (Martins *et al.*, 2013; Choppala *et al.*, 2014).

A presença de Cd pode provocar o aumento descontrolado da concentração de espécies reativas de oxigénio (utiliza-se neste trabalho a sigla mais comum, ROS, do inglês *reactive*

oxygen species) e consequentemente provocar danos em lípidos, proteínas, glúcidos e ADN (Mithöfer *et al.*, 2004; Mourato *et al.*, 2012).

Os ácidos gordos insaturados de membranas lipídicas são particularmente suscetíveis à oxidação por ROS, aumentando a rutura das membranas (Mourato *et al.*, 2012). A peroxidação provoca a degradação de lípidos e das funções da membrana (Gupta, 2011). A peroxidação lipídica ocorre através de uma série de reações em cadeia (iniciação, progressão e terminação) que se iniciam por ação enzimática ou não enzimática (Mithöfer *et al.*, 2004; Gupta, 2011). A reação pode iniciar-se quando as ROS, como o radical hidroxilo (principal mediador não enzimático desta reação), removem um hidrogénio a partir de um carbono da molécula de ácido gordo (principalmente na insaturação), ou por ação de lipogenases (Mithöfer *et al.*, 2004; Gupta, 2011). Um átomo de oxigénio pode ligar-se facilmente, em seguida, a esse local formando um radical peroxilo, que pode continuar a propagar o mesmo tipo de reações (Mourato *et al.*, 2012). A tolerância a danos induzidos pelo stresse oxidativo é associada a baixos níveis de peroxidação lipídica (Gupta, 2011).

As proteínas podem também sofrer oxidação por ROS, causando a perda de certas enzimas bem como a sua função. Um dos locais mais suscetíveis das proteínas são os grupos tiol, a oxidação destes pode levar à desnaturação proteica e consequentemente à perda da conformação funcional (Møller *et al.*, 2007). A oxidação de proteínas pode também levar à produção de grupos carbonilo e aumentar a taxa de proteólise (Mourato *et al.*, 2012).

O ADN pode também ser degradado por ROS, pela degradação das bases azotadas de nucleótidos, causando mutações e defeitos genéticos. Os polissacáridos da parede celular podem facilmente reagir com o radical hidroxilo, e isto também pode ser um mecanismo de defesa, caso os radicais reajam com estes glúcidos antes de danificar mais moléculas biologicamente importantes (Møller *et al.*, 2007).

Os danos no aparelho fotossintético podem surgir da inibição direta da síntese de clorofila ou de restrições na absorção e translocação de Fe e Mg, bem como de alterações gerais das reações da fotossíntese, com consequente influência no transporte de eletrões (Benavides *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2013). O Cd pode provocar a inibição da Fe(III) redutase induzindo a deficiência em Fe(II) e afetando consequentemente o sistema fotossintético (Benavides *et al.*, 2005). O Cd diminui a pressão parcial de CO₂ nos estomas, diminuindo a sua concentração e a condutância estomatal, consequentemente ocorre o fecho dos estomas e a diminuição da transpiração, sendo a atividade da Rubisco também afetada (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). A presença de ROS em excesso também pode provocar danos nos cloroplastos (Mourato *et al.*,



2015), sendo observada a degradação do sistema fotossintético. A diminuição da atividade da nitrato-redutase induz a menor absorção e transporte de nitrato da raiz para a parte aérea.

No que respeita ao aspeto exterior, a toxicidade do Cd pode ser detetada pela limitação do crescimento, sendo característico o crescimento atrofiado de raízes e da parte aérea, baixa biomassa, menor área foliar e aparecimento de cloroses. A morfologia e arquitetura das raízes também pode sofrer alterações, devido a uma proliferação anormal das células radiculares, podendo apresentar menor comprimento e menor volume, o que, consequentemente, pode levar à restrição de absorção de água e elementos essenciais (Martins *et al.*, 2013).

As alterações que podem ocorrer nos tecidos vegetais podem variar consoante a espécie da planta e as condições de stresse a que a planta está sujeita. Em algumas espécies, a toxicidade de Cd expressa-se a nível celular pela formação de uma aberração cromossómica e alteração do ciclo e divisão celular, que podem apresentar-se exteriormente por cloroses e enrolamento de folhas (DalCorso *et al.*, 2010; Ozyigit *et al.*, 2013). Em situações em que os efeitos do stresse não são visíveis ou facilmente detetáveis visivelmente, as plantas podem apresentar-se visualmente sãs mas contendo quantidades elevadas de Cd ou de outros metais pesados. Quando consideramos plantas alimentares, a falta de sintomas visuais pode levar a que o vegetal não seja rejeitado e seja consumido, existindo o risco de entrada do Cd na cadeia alimentar, podendo atingir o ser humano, por ingestão direta de produtos vegetais frescos ou processados, ou de forma indireta, através da ingestão de produtos animais também eles já contaminados.

1.1.3. Toxicidade de Cd para o Ser Humano

O Cd está entre os metais pesados mais frequentemente associado a intoxicações no Homem (Godt *et al.*, 2006). Este metal é tóxico em níveis mais baixos para animais, por comparação com as plantas, pelo que o consumo de plantas contaminadas pode ser tóxico para animais incluindo o Homem.

O Cd pode provocar toxicidade aguda, quando associada a acidentes durante a extração e uso industrial, ou toxicidade crónica, mais frequente, causada por ingestão e/ou inalação durante longos períodos de exposição.

Em mamíferos, o Cd é transportado como complexos proteína-Cd, principalmente através de metalotioneinas (MT-Cd), sendo armazenados no rim, no fígado e nas mucosas intestinais, com um tempo de retenção de 10 anos (Klaassen *et al.*, 2009; Peralta-Videa *et al.*, 2009).

As principais vias de exposição humana ao Cd são a ingestão de alimentos e águas contaminadas e respiração de ar contaminado (Varennnes, 2003; Klaassen *et al.*, 2009). Em fumadores, deve-se considerar o tabaco como uma das principais fontes de contaminação por Cd, dado que a planta do tabaco tem elevada capacidade de acumulação deste (Pan *et al.*, 2010). Segundo os dados da *European Food Safety Authority* (EFSA), os fumadores podem ingerir uma quantidade de Cd por via oral equivalente à que é ingerida pela alimentação (EFSA, 2009).

Tanto a toxicidade crónica como a aguda podem provocar nos seres humanos graves problemas de saúde, devido a diversos órgãos poderem ser afetados (Klaassen *et al.*, 2009).

Segundo a IARC (*International Agency for Research Cancer – OMS*), o Cd é considerado um carcinogénico humano capaz de produzir tumores na laringe, próstata e outros tecidos (Klaassen *et al.*, 2009).

O caso mais conhecido de intoxicação por Cd é a doença “itai itai” (representando uma onomatopeia de dor em japonês) que afetou agricultores japoneses que viviam na bacia do rio Jinza durante a II Guerra Mundial. As plantações de arroz, que eram a base da sua alimentação, foram contaminadas com Cd devido a extrações de Pb e Zn nas proximidades, originando um grau de exposição à contaminação muito elevado e persistente. O Cd apresentou neste caso um maior efeito na saúde humana pois, ao contrário do Pb, é mais facilmente translocado para a parte aérea da planta.

Em 2010, o Comité OMS/FAO reavaliou e estabeleceu uma ingestão tolerável mensal provisória (PTMI, do inglês *provisional tolerable monthly intake*) de Cd de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal, refletindo o seu longo tempo de meia-vida em seres humanos. As estimativas de exposição alimentar média ao Cd, variou para adultos entre 2,2 e $12 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal por mês (9-48 % do PTMI); para as crianças europeias até 12 anos de idade, a exposição alimentar média ao Cd foi de $11,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal por mês (47 % do PTMI) (OMS, 2013). Mais recentemente, a EFSA estabeleceu para a ingestão tolerável semanal provisória um valor bastante mais baixo de $2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal (EFSA, 2012).

1.2. Mecanismos de defesa das plantas ao stresse oxidativo induzido por metais

As plantas são seres imóveis, não se podendo deslocar de zonas contaminadas para zonas descontaminadas, de modo a prevenir danos nos seus tecidos. Por este motivo as plantas



desenvolveram mecanismos de defesa contra o stresse abiótico ou biótico induzido pelo exterior.

Os metais pesados causam stresse oxidativo nas plantas, o qual será caracterizado neste capítulo. Dependendo da espécie, do tipo de metal e das condições de crescimento, as plantas desenvolveram estratégias para lidar com condições de stresse, como forma de impedir ou diminuir a assimilação desses metais, evitando a sua acumulação excessiva nos tecidos. Estas estratégias passam por mecanismos externos de restrição da absorção, ou após absorção, pela ativação de mecanismos antioxidantes de defesa, enzimáticos e não enzimáticos (Peralta-Videa *et al.*, 2009; Mourato *et al.*, 2012).

Quando os metais são absorvidos pelas plantas, permanecendo nos seus tecidos, induzem direta ou indiretamente a produção de moléculas sinalizadoras de stresse, como as espécies reativas de oxigénio (ROS).

As ROS são formas parcialmente reduzidas do oxigénio atmosférico (O_2), que resultam da excitação do O_2 para formar singleto de oxigénio (1O_2), ou da transferência de um, dois ou três eletrões para formar o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ou o radical hidroxilo (HO^{\bullet}), respetivamente (Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004). Esta produção das diferentes ROS por transferência de energia ou redução sequencial do estado fundamental de tripleto de oxigénio, é apresentada na figura 1.5.

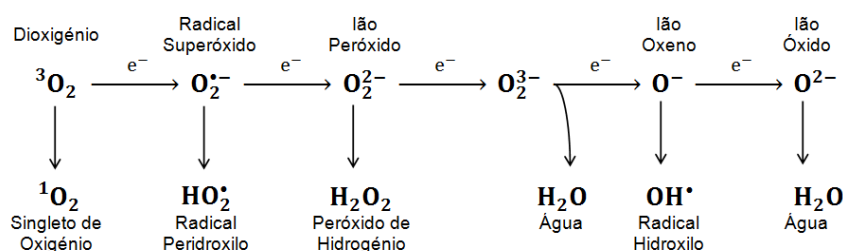


Figura 1.5 - Produção de diferentes ROS por transferência de energia ou redução sequencial univalente do estado fundamental tripleto de oxigénio (adaptado de Apel & Hirt, 2004).

Estas espécies surgem naturalmente do metabolismo aeróbio, em processos como a fotossíntese e a respiração (Mittler, 2002; Navrot *et al.*, 2007; Mourato *et al.*, 2012). Em células vegetais, a maior parte das ROS são produzidas nos cloroplastos ou peroxissomas, mas no escuro as ROS produzidas na mitocôndria predominam, podendo ser também produzidas na membrana plasmática ou no apoplasto (Navrot *et al.*, 2007; Møller *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*,

2008). Outras fontes de produção de ROS são as NADPH-oxidases, amina-oxidases, e peroxidases da parede celular (Mourato *et al.*, 2012).

Em condições ditas normais estas moléculas são eliminadas por sequestro ou decomposição por diferentes compostos de defesa com ação antioxidante. O equilíbrio do balanço entre a produção e eliminação de ROS é um processo estritamente controlado pela célula. Contudo, condições adversas do meio (excesso de luz, baixa temperatura, presença de metais, seca, cortes, interferentes bióticos, etc.) podem provocar o seu desequilíbrio. Este desequilíbrio, caracterizado pela presença excessiva de ROS, denomina-se por stresse oxidativo (Apel & Hirt, 2004).

O singlete de oxigénio é uma espécie altamente reativa (tempo meia vida de 1 μ s em água), produzida principalmente no fotossistema II dos cloroplastos, mas também pode resultar da atividade da lipoxigenase (Apel & Hirt, 2004; Møller *et al.*, 2007; Mourato *et al.*, 2012). Esta espécie degrada preferencialmente ligações duplas conjugadas presentes em ácidos gordos polinsaturados (AGPI), sendo esta degradação identificada através da deteção de vários aldeídos como o malondialdeído (MDA) formado pela peroxidação destes ácidos gordos (Møller *et al.*, 2007; Mourato *et al.*, 2012).

O radical superóxido é produzido tanto em cloroplastos (fotossistemas I e II), como em mitocôndrias, em peroxissomas e pela NADPH-oxidase presente na membrana plasmática (Møller *et al.*, 2007; Mourato *et al.*, 2012). É uma espécie com reatividade relativa média, apresentando um tempo de meia vida entre 2 a 4 μ s, em peroxissomas. A superóxido-dismutase pode catalisar a conversão do superóxido em peróxido de hidrogénio (Møller *et al.*, 2007).

O peróxido de hidrogénio é produzido principalmente nos peroxissomas e na mitocôndria (Rhoads *et al.*, 2006; Møller *et al.*, 2007). É uma espécie com baixa reatividade e com um tempo de vida de 1 ms. Não é um radical e pode facilmente atravessar as membranas difundindo-se pelas células (Mourato *et al.*, 2012). É uma espécie reativa com uma função de sinalização específica nas células, tal como o singlete de oxigénio e o superóxido (Navrot *et al.*, 2007).

Embora o peróxido de hidrogénio e o radical superóxido sejam as espécies menos reativas são produzidas em grandes quantidades nas células e podem iniciar outras reações que conduzem a espécies mais prejudiciais (Møller *et al.*, 2007).

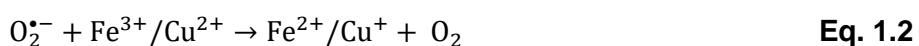
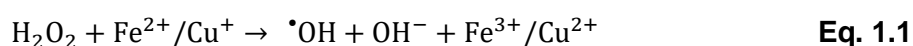
De todas as espécies de ROS mencionadas, o radical hidroxilo é uma das espécies mais reativas, (tempo de vida curto, 1 ns) e não se conhecem sistemas antioxidantes enzimáticos



capazes de o eliminar (Mithöfer *et al.*, 2004; Mourato *et al.*, 2012). Pode ser formado a partir de peróxido de hidrogénio pela reação de Fenton (catalisada por ferro ou outros metais de transição).

Alguns metais podem causar diretamente o aumento de produção de ROS como Cu, Zn e Fe, por participação direta em reações redox ou via reações de Fenton (DalCorso *et al.*, 2013). Pelas reações de Fenton (equações 1.1 e 1.2), na presença de metais de transição redox ativos como o Cu^+ e o Fe^{2+} , o H_2O_2 é convertido em HO^\bullet . Os iões metálicos oxidados passam por uma re-redução, numa reação subsequente com $\text{O}_2^{\bullet-}$. Outro mecanismo, independente da presença do metal, e que também origina radicais HO^\bullet , diretamente de H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$, designa-se reação de *Haber-Weiss* (equação 1.3), representada de seguida (Mithöfer *et al.*, 2004):

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:



O Cd é um metal não diretamente ativo em reações redox e embora não atuando diretamente na produção de ROS promove indiretamente a sua produção, por exemplo por substituição do Fe em proteínas, aumentando os níveis de Fe livre e induzindo a reação de Fenton (Cuypers *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2013; Choppala *et al.*, 2014). Gallego *et al.* (2012) refere também que o Cd pode levar à ativação da NADPH-oxidase na membrana e consequentemente, causar o aumento da produção de H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Quando o balanço de ROS é alterado, por existirem ROS em excesso, estes causam danos celulares de natureza oxidativa, como a peroxidação dos lípidos que, consequentemente, reagem com proteínas, outros lípidos e ácidos nucleicos, degradando ou destruindo membranas, organelos celulares e biomoléculas (Mittler, 2002; Rhoads *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2013; Choppala *et al.*, 2014).

As ROS atuam não só como indutoras de stresse oxidativo, mas simultaneamente como espécies sinalizadoras, e desta forma regulam a ativação da expressão génica em resposta a condições adversas, atuando em conjunto com compostos com capacidade de se mover

pela planta e ativar a produção de ROS noutras partes desta (Mittler, 2002; Navrot *et al.*, 2007; Mittler *et al.*, 2011).

Segundo Mittler *et al.* (2011) várias vantagens surgem quando se considera o uso de ROS como moléculas de sinalização. De entre essas vantagens distinguem-se:

- A capacidade da célula para produzir e remover rapidamente diferentes formas de ROS, permitindo simultaneamente que ocorram mudanças rápidas e dinâmicas nestes níveis (provocada por alteração do equilíbrio entre a produção celular e as taxas de remoção).
- O controlo apertado sobre a localização sub-celular de ROS nas células. Isto significa que o aumento da produção de ROS pode ser limitado a determinados locais na célula, tornando o controlo espacial e acumulação de ROS altamente específicos.
- As ROS podem ser usadas como uma auto-propagação rápida de longa distância de sinais transferidos em toda a planta. Cada célula individual ao longo do caminho do sinal pode ativar o seu mecanismo de produção de ROS de forma autónoma, carregando um sinal de ROS a longas distâncias.
- A existência de diferentes formas de ROS, com diferentes propriedades moleculares, faz destas, moléculas de sinalização versáteis. Por exemplo o radical superóxido é uma molécula carregada na maioria das condições fisiológicas e não pode ser transportada passivamente através das membranas. Contudo esta molécula pode ser facilmente transformada em peróxido de hidrogénio, que é passivamente transferido pelas membranas celulares. Ambas as moléculas podem mediar a peroxidação dos lípidos tornando as membranas solúveis.
- A estreita ligação das ROS com a homeostase celular e o metabolismo. Alterações na homeostase celular, bem como em condições fisiológicas que favoreçam a fotorrespiração levam à alteração do nível estável de ROS. Deste modo as ROS surgem também como bons sinalizadores de alterações no metabolismo celular.

As plantas desenvolvem diferentes estratégias e mecanismos de defesa para lidar com elevadas concentrações de Cd nas suas células, que dependem do genótipo, do tipo de stresse e do ambiente em que se encontram (Martins *et al.*, 2013; Choppala *et al.*, 2014). Estas estratégias incluem a ativação de mecanismos de eliminação e mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, que permitem que a planta controle os níveis de ROS produzidos em excesso, em resposta ao stresse, bem como os danos oxidativos que podem levar à morte celular (Gallego *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013). São os mecanismos



de defesa, de natureza antioxidante, que ao atuarem de forma concertada e coordenada, irão constituir um sistema protetor contra os danos de natureza oxidativa que os ROS podem causar nas células e nos seus componentes.

Outras moléculas sinalizadoras, produzidas pela oxidação de carotenoides, como as hormonas ácido abísico (ABA do inglês *abscisic acid*) e estrigolactonas, aromas voláteis como β -ionona e β -ciclocitral ou outros pigmentos, têm sido recentemente descritos como responsáveis pela ativação de determinados mecanismos de defesa (Esteban *et al.*, 2015).

1.2.1. Sistema antioxidante enzimático

Como mecanismos de defesa enzimáticos destacam-se as enzimas catalase (CAT, EC 1.11.1.6), guaiacol-peroxidase (GPOD, EC 1.11.1.7), superóxido-dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), ascorbato-peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), glutathione-peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) e glutathione-redutase (GR, EC 1.8.1.7), entre outras. Algumas destas enzimas atuam diretamente sobre algumas ROS, outras fazem parte de sistemas mais complexos que também atuam sobre a degradação dessas espécies, e desta forma apresentam ainda uma função regeneradora de substratos redutores, como a glutathione e o ascorbato.

A CAT existe principalmente nos peroxissomas, organelos que aumentam o seu número durante a exposição a um stresse (Mourato *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013). Esta enzima catalisa a transformação de H_2O_2 em água (H_2O), obtendo-se H_2O e O_2 : $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (Mittler, 2002; Ahmad *et al.*, 2008). Embora tenha uma elevada taxa de reação, a CAT apresenta menor afinidade para o H_2O_2 relativamente à APX pelo que são normalmente mais ativas em meios em que as quantidades de H_2O_2 são mais elevadas (Mittler, 2002).

As peroxidases (POD) são uma extensa família de enzimas omnipresentes na célula, com inúmeras funções no metabolismo (Mourato *et al.*, 2012). Têm um papel importante na eliminação de peróxido de hidrogénio mas a sua atividade também pode ser responsável por processos de lenhificação que limitam o alongamento das células, como uma adaptação mecânica ao stresse provocado por Cd, podendo ser uma consequência da acumulação de ROS (Martins *et al.*, 2013).

A GPOD é uma peroxidase que elimina o H_2O_2 na presença de substratos fenólicos como o guaiacol: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Guaiacol reduzido} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{Guaiacol oxidado}$ (Gajewska *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2008). Gorinova *et al.* (2007) relatam a existência de possíveis novas isoformas

de GPOD sob toxicidade de Cd. A sua determinação analítica é geralmente usada como uma medida da atividade peroxidásica genérica nas células.

A APX é uma peroxidase que utiliza o ascorbato reduzido (AsA) como dador de eletrões para a eliminação de H_2O_2 : $H_2O_2 + AsA \rightarrow 2H_2O + MDHA$, formando monodesidroascorbato (MDHA), ou seja a forma oxidada resultante (Ahmad *et al.*, 2008). Esta enzima apresenta elevada afinidade para o H_2O_2 sendo capaz de atuar mesmo em baixas concentrações desta espécie, facto que a torna uma enzima muito importante na regulação do peróxido de hidrogénio como uma molécula de sinalização (Mittler, 2002; Cuypers *et al.*, 2011). Deste modo, a APX é responsável pela manutenção de baixos níveis de ROS, enquanto que a CAT (com menor afinidade para o H_2O_2) é responsável pela remoção do seu excesso (Mourato *et al.*, 2012).

A GPX atua sobre H_2O_2 utilizando a glutathiona (GSH) como dador de eletrões formando-se glutathiona oxidada (GSSG): $H_2O_2 + GSH \rightarrow H_2O + GSSG$ (Mittler, 2002). A GPX compete assim com a CAT pelo substrato, H_2O_2 , sendo considerada como a maior fonte de proteção contra baixos níveis de stresse oxidativo (Ahmad *et al.*, 2008), não é específica para um substrato aceitador de eletrões, pode reduzir H_2O_2 e hidroperóxidos de lípidos (Passaia & Margis-Pinheiro, 2015). A sua atividade tem sido detetada no citosol e no estroma de cloroplastos (Mittler *et al.*, 2004). Segundo Mittler (2002) em plantas onde é suprimida a atividade da CAT, é induzida a atividade da APX e GPX.

A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra o stresse oxidativo, sendo capaz de catalisar a transformação de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 de acordo com a reação: $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (Mittler, 2002; Mourato *et al.*, 2012; Mourato *et al.*, 2015). Existem três tipos de SOD, de acordo com o cofator associado, que se localizam em compartimentos celulares diferentes (Martins *et al.*, 2013). A FeSOD encontra-se nos cloroplastos, MnSOD na mitocôndria e peroxissomas e Cu/ZnSOD nos cloroplastos, citosol e no apoplasto. A ação desta enzima tem como produto o H_2O_2 , e este é consequentemente eliminado por ação da CAT e/ou outras peroxidases (Mourato *et al.*, 2012).

A GR não atua diretamente sobre ROS mas é responsável pela regeneração da GSH que ocorre no ciclo da glutathiona-ascorbato (figura 1.6b) com o consumo de NADPH (Mittler, 2002; Martins *et al.*, 2013). Dado o seu envolvimento nesta via metabólica, esta é uma enzima considerada muito importante no mecanismo de defesa ao stresse induzido por Cd (Martins *et al.*, 2013).



A regeneração da GSH é um processo da maior importância na resposta antioxidante, por várias razões: é substrato da GPX (figura 1.6c), sendo também responsável pela eliminação de H_2O_2 , e porque é utilizada na produção de tióis não proteicos (como fitoquelatinas) que têm uma ação muito relevante nos mecanismos de defesa contra o efeito tóxico de metais, nomeadamente o Cd. A monodesidroascorbato-redutase (MDHAR) e a desidroascorbato-redutase (DHAR) são enzimas também importantes neste ciclo, pois permitem a regeneração do ascorbato utilizado pela APX.

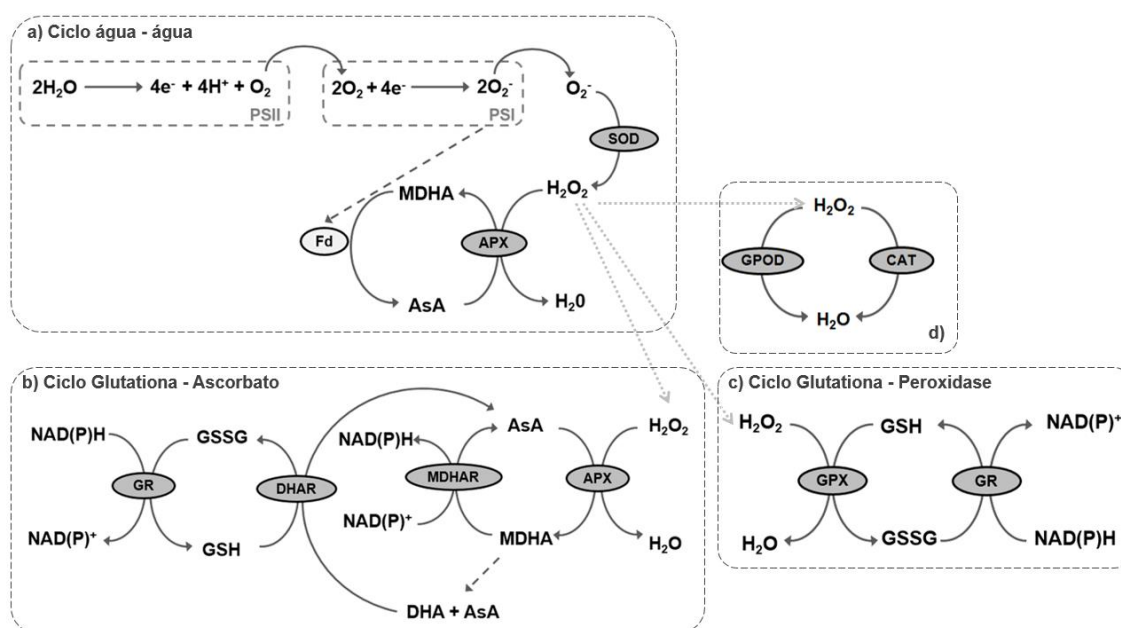


Figura 1.6 - Vias de eliminação de ROS em tecidos vegetais: a) ciclo água-água, b) ciclo glutaciona-ascorbato, c) ciclo glutaciona-peroxidase e d) atividade individual de enzimas. SOD – superóxido-dismutase; APX – ascorbato-peroxidase; GPOD – guaiacol-peroxidase; CAT – catalase; DHAR – desidroascorbato-redutase; MDHAR – monodesidroascorbato-redutase; GPX – glutaciona-peroxidase; GR – glutaciona-redutase. PS – fotossistema; Fd - ferredoxina; AsA – ascorbato reduzido; MDHA – monodesidroascorbato; DHA – desidroascorbato (adaptado de Asada, 1999; Mittler, 2002 e Mourato *et al.*, 2012).

A APX e também a SOD, atuando em conjunto nos cloroplastos para eliminar $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 formam um mecanismo fundamental de proteção contra danos oxidativos. Este mecanismo é denominado ciclo água-água (figura 1.6a), e a eliminação destas ROS impede que a sua reatividade provoque danos a nível celular (Mourato *et al.*, 2012).

Estes sistemas enzimáticos atuam de forma coordenada de modo a assegurar não só a remoção ativa de ROS como também a regeneração dos substratos redutores, que fazem parte do sistema antioxidante não enzimático, tal como representado na figura 1.6.

O estudo do comportamento da atividade enzimática antioxidante deve ser cuidadosamente avaliado, pois por um lado o aumento da atividade enzimática sugere a diminuição da concentração de ROS, mas por outro pode ocorrer uma maior concentração de ROS por exposição da planta ao stresse (Martins *et al.*, 2013).

1.2.2. Sistema antioxidante não enzimático

Os mecanismos de defesa não enzimáticos englobam moléculas responsáveis pelo sequestro e mobilização do metal, ou ainda moléculas que são capazes de atuar diretamente na remoção de ROS por se oxidarem preferencialmente, podendo estar relacionadas com os mecanismos enzimáticos já referidos.

O ciclo glutathiona-ascorbato permite a regeneração de antioxidantes não enzimáticos, como o AsC e a GSH, através da atividade de enzimas específicas, como referido anteriormente. A GSH é ainda utilizada para a síntese de fitoquelatinas (PC, do inglês *phytochelatins*) que são os principais agentes quelantes ou sequestradores (*scavengers*) de Cd (DalCorso *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2014; Serrano *et al.*, 2015). Outros quelantes como ácidos orgânicos (AO), aminoácidos e metalotioneínas (MT) também são descritos por outros autores como importantes nos processos de tolerância dos organismos ao stresse provocado por metais pesados (Clemens, 2006b; DalCorso *et al.*, 2010; Fernández, *et al.*, 2012; Gallego *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013; Mourato *et al.*, 2012). Os carotenoides fazem também parte integrante dos mecanismos de defesa, funcionando como inibidores de ROS, dado que atuam como poderosos antioxidantes neste processo através do sistema conjugado de duplas ligações que possuem (Mourato *et al.*, 2012; Jomava & Valko, 2013; Esteban *et al.*, 2015). A prolina é um aminoácido também descrito como mecanismo de defesa de plantas relativamente ao stresse abiótico.

O ascorbato é um importante antioxidante das plantas e é um dador de eletrões capaz de se oxidar a monodesidroascorbato (MDHA) e consequentemente a desidroascorbato (DHA) (Potters *et al.*, 2002; Mourato *et al.*, 2012). É um dos sequestradores de ROS mais importante nas células vegetais, sendo muito importante em mecanismos de defesa antioxidante como sequestrador direto de $^1\text{O}_2$ e de $\text{O}_2^{\cdot-}$, capaz de regenerar α -tocopherol, protegendo as



membranas (Ahmad *et al.*, 2008a). Além disso é substrato de enzimas como a APX, que faz parte do sistema antioxidante enzimático. Existe na maioria dos tecidos vegetais e apresenta tendência para ser mais concentrado em folhas do que em raízes (Sminorff, 2005). Vários autores têm descrito o aumento de níveis de AsC como resposta contra o stresse oxidativo induzido por Cd (Demirevska-Kepova *et al.*, 2006). O AsC desempenha um papel importante na minimização de danos causados por processos oxidativos, principalmente devido à sua ação sinérgica com outros antioxidantes, como carotenoides e tocoferóis (Foyer & Noctor, 2005).

A glutathiona é um tripeptido (contendo glutamato, glicina e cisteína) que pode ocorrer na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG) (Jozefczak *et al.*, 2012). Em inúmeras reações, os grupos tiol da cisteína são oxidados de modo a formar GSSG, sendo os níveis de GSH:GSSG mantidos pela GR, tal como referido anteriormente (Foyer *et al.*, 2005). A GSH é ainda utilizada pela GPX como substrato para a destoxificação de H_2O_2 em água, no ciclo glutathiona-ascorbato. Além disso, esta está diretamente envolvida na defesa contra o stresse oxidativo e é também o substrato para a biossíntese de fitoquelatinas (DalCorso *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2014; Serrano *et al.*, 2015). A glutathiona pode também formar complexos com Cd tendo assim um papel direto na destoxificação deste metal (Burzynski *et al.*, 2005; Polec-Pawlak *et al.*, 2007). Vários autores descrevem uma diminuição dos níveis de GSH e um aumento concomitante da GSSG sob stresse induzido por Cd (ou uma diminuição da razão GSH / GSSG), confirmando o envolvimento ativo da glutathiona na defesa antioxidante da planta (Balestrasse *et al.*, 2001; Aravind & Prasad, 2005; Cuypers *et al.*, 2011).

Vários autores referem a produção de PC por plantas quando expostas a Cd, pela afinidade desta substância para o Cd e pela estabilidade dos complexos formados, como o sistema mais importante do mecanismo de resposta a esse metal (Clemens, 2006b; Wood & Feldmann, 2012; Fernández *et al.*, 2012; Choppala *et al.*, 2014). Ao contrário do que acontece com os outros compostos já referidos com funções antioxidantes, as PC não apresentam qualquer outra função celular conhecida.

As PC têm na sua constituição três aminoácidos (Glu - glutamato, Cys - cisteína e Gly - glicina), com Glu e Cys unidos por uma ligação Y-carboxilamida, sendo as PCn estruturas com crescentes repetições de dipetidos Y-Glu-Cys com terminal Gly, (Y-Glu-Cys)_n-Gly (figura 1.7) (Serrano *et al.*, 2015). Estas moléculas são tióis não proteicos (NPT) sintetizados utilizando GSH (glutathiona reduzida) através de PC-sintetases; os grupos tiol (SH) dos resíduos de cisteína das PC servem como dadores de eletrões aos iões metálicos dadas as suas propriedades redutoras (Park *et al.*, 2011; Wood & Feldmann, 2012; Bashir *et al.*, 2013).

Chopalla *et al.* (2014) refere a influência do enxofre (S) na adubação sobre a redução da translocação de Cd e toxicidade das plantas. Na figura 1.7 está representada a estrutura química da fitoquelatina designada PC2.

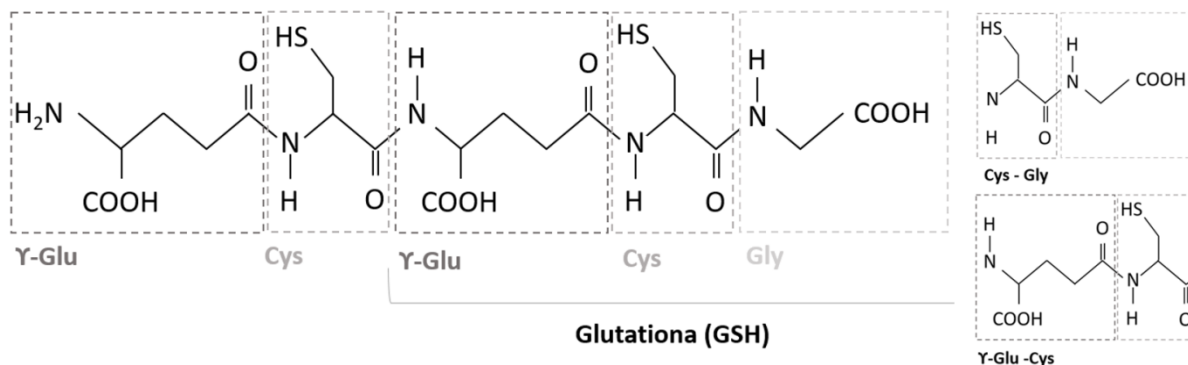


Figura 1.7 - Estrutura Química da PC2 (duas repetições do dipéptido Y-Glu-Cys com um terminal Gly); Glu – glutamato, Cys – cisteína, Gly - glicina (adaptado de Serrano *et al.*, 2015).

O mecanismo de destoxificação por complexos PC-Cd não reflete apenas a formação do complexo mas também a acumulação deste nos vacúolos, limitando a interferência metabólica e a atividade deste metal no citosol (Park *et al.*, 2011; Chopalla *et al.*, 2014). Alguns autores referem a importância do Cd na indução da síntese de PC (Dago *et al.*, 2014; Serrano *et al.*, 2015), no entanto, a formação de complexos de PC com outros metais tóxicos também pode ocorrer. Serrano *et al.* (2015), refere que se diferentes metais competirem pela ligação às PC verifica-se tipicamente uma afinidade decrescente destes catiões bivalentes: $\text{Hg} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Pb} \sim \text{Zn}$, bem como a possibilidade da formação de complexos com metais diferentes como por exemplo CdPbPC_2 .

Os ácidos orgânicos (AO) são moléculas também descritas como intervenientes em mecanismos de tolerância a metais pesados, uma vez que se podem ligar a iões metálicos tóxicos, formando complexos estáveis e, por conseguinte, restringir a sua toxicidade biológica (Arneloti *et al.*, 2008; Keunen *et al.*, 2011; Mourato *et al.*, 2012). A principal via de obtenção de AO em plantas é o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs) que ocorre em mitocôndrias como parte central do metabolismo primário. Um maior funcionamento do ciclo de Krebs resulta num aumento do fluxo de produção de ácidos orgânicos na matriz mitocondrial (Keunen *et al.*, 2011; Gajewask, 2013).



Os AO, tais como ácido cítrico, ácido málico e ácido oxálico, têm sido referidos como tendo um papel específico como ligandos celulares particularmente importantes no sequestro de metais como o Cd, Fe, Ni e Zn (Bominathan & Doran, 2003; Keunen *et al.*, 2011). Têm também uma ação importante no transporte de Cd para o vacúolo em plantas vasculares, via xilema (Taiz & Zeiger, 2002, Arneloti *et al.*, 2008; Bai *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014). O vacúolo tem um papel reconhecidamente importante no armazenamento de substâncias tóxicas e contaminantes e dessa forma funciona como uma estratégia de defesa contra a fitotoxicidade dessas substâncias. Os ácidos orgânicos, através da afinidade para cátions específicos, como é o caso do Cd, conseguem estabelecer formas ligadas com relativa estabilidade e transportá-los dentro da planta para os vacúolos, tanto na parte aérea como nas raízes.

No solo, os AO são componentes importantes para a solubilização de metais que resultam de fases minerais insolúveis no solo, aumentando a sua mobilidade na proximidade das raízes e aumentando a biodisponibilidade de metais para plantas (Han *et al.*, 2006).

Os carotenoides são moléculas hidrofóbicas que na conformação *trans* são lineares e de estrutura rígida, mas os isômeros *cis* com geometria diferente, não são lineares tornando-os mais solúveis e facilmente absorvidos e transportados para compartimentos celulares (Jomava & Valko, 2013). Estes compostos são conhecidos como pigmentos acessórios da fotossíntese, apresentam estrutura isoprenoide, e cuja cor varia de amarelo a vermelho. O diferente comprimento do sistema cromóforo leva a alterações no espectro do visível e consequentemente nas cores visíveis ao olho humano: α -caroteno (α -Car), luteína (Lut) e anteroxantina (Ant) apresentam coloração amarela, violoxantina (Vio) coloração amarela clara e β -caroteno (β -Car) e zeaxantina (Zea) coloração laranja.

Dentro dos carotenoides podem-se distinguir dois grupos: os carotenos (β e α) e as xantofilas. A estrutura básica destes pigmentos são oito unidades de isopreno (40 carbonos, estrutura tetraprenóide), unidas de tal modo que ocorre a reversão da parte central da molécula (figura 1.8) (Ribeiro & Seravalli, 2007; Esteban *et al.*, 2015).

São as propriedades físicas e químicas destas moléculas que determinam as funções essenciais que têm nas plantas. Os carotenoides apresentam importantes funções na interação planta-ambiente, tais como: atuação como fotorreceptores/fotoprotetores (recetores de luz em excesso); biossíntese de fito-hormonas (ácido abscísico e estrigolactonas) sinalizadoras de stresse; ou biossíntese de compostos que atuam como atrativos visuais e *olfativos* para agentes polinizadores e dispersores de sementes (Esteban *et al.*, 2015). As

xantofilas são formas isoprenóides hidroxiladas com uma função importante na estabilização do fotossistema I (PSI).

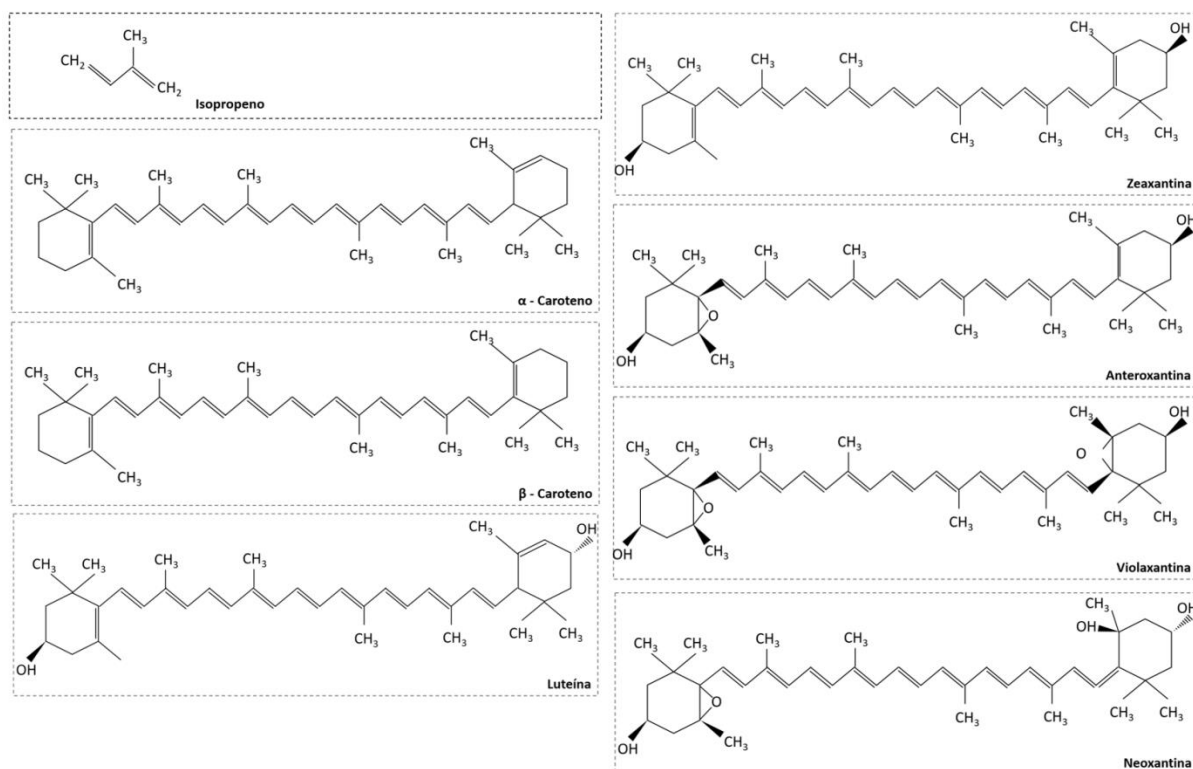


Figura 1.8 - Estrutura química dos carotenoides (carotenos: α -caroteno e β -caroteno; xantofilas: luteína, zeaxantina, neoxantina, anterioxantina e violaxantina) e a sua unidade fundamental, isopreno (adaptado de Esteban *et al.*, 2015 e Pub Chem - Open Chemistry Database).

O importante papel dos carotenoides na sinalização de stresse oxidativo e no mecanismo de defesa antioxidante relaciona-se com os metabolitos resultantes da oxidação de β -caroteno pelo singlete de oxigénio. A oxidação de β -caroteno pelo singlete de oxigénio é uma fase inicial do processo de stresse luminoso, pelo que os metabolitos voláteis resultantes da oxidação atuam como sensores primários do stresse (à luz) em plantas. A concentração de hormonas ABA, que resultam da oxidação e conversão de carotenoides, aumenta quando a planta é exposta a stresse abiótico levando à indução de síntese de ROS e consequentemente à sinalização de stresse oxidativo (Apel & Hirt, 2004; Roychoudhury *et al.*, 2012; Esteban *et al.*, 2015).



Por outro lado os carotenoides são potentes inibidores e sequestradores de ROS e radicais livres. Esteban *et al.* (2015) referiu que o β -caroteno atua especificamente sobre o singlete de oxigénio enquanto que a neoxantina atua sobre o anião superóxido.

Para inibirem as ROS, os carotenoides utilizam quatro mecanismos principais:

i) a oxidação ($Car + R^{\bullet+} \rightarrow Car^{\bullet+} + R$);

ii) a redução ($Car + R^{\bullet-} \rightarrow Car^{\bullet-} + R$);

iii) a perda de hidrogénio formando um radical neutro ($Car[H] + R^{\bullet} \rightarrow Car^{\bullet} + RH$);

iv) a adição (com radicais peroxilo ou hidroxilo formando uma molécula de carotenoides com radicais: $Car + ROO^{\bullet} \rightarrow [Car - ROO]^{\bullet}$; esta molécula pode reagir novamente com outro radical formando um produto não radical: $[Car - ROO]^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightarrow ROO - Car - ROO$) (Jomava & Valko, 2013).

A resposta antioxidante dos carotenoides pode ocorrer em conjunto com outros compostos da planta. Por exemplo: a Zeoxantina previne a foto-oxidação em conjunto com tocoferóis sob condições de elevada luminosidade ou exposição a metais pesados; os pigmentos do ciclo de xantofilas (ciclo VAZ, de Vio Ant e Zea) em conjunto com a superóxido-dismutase (SOD) conferem proteção ao sistema fotossintético contra danos oxidativos (Esteban *et al.*, 2015).

A **prolina** é um aminoácido que se acumula rapidamente e mais frequentemente do que qualquer outro aminoácido, sob condições ambientais desfavoráveis, tais como a seca, salinidade e a presença de metais pesados (Huang & Wang, 2010; Bashir *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2013a). O papel protetor da prolina tem sido atribuído à sua capacidade para atuar na regulação osmótica, na proteção de enzimas e na estabilização de estruturas sub-celulares, bem como na eliminação/sequestro de ROS (Gajewska *et al.*, 2006; Huang & Wang, 2010).

A prolina é sintetizada através de duas vias diferentes, a partir de glutamato ou de ornitina e arginina (Li *et al.*, 2012). Embora tenha sido demonstrado que a concentração de prolina aumenta, em algumas plantas, quando expostas a metais pesados (Martins *et al.*, 2010), o seu papel concreto nesta destoxificação não é claro, dado que, em determinadas condições, poderia ser apenas uma resposta indireta devido a perturbações induzidas por metais pesados no balanço hídrico da planta (Mourato *et al.*, 2012).

1.3. Planta de espinafre

O espinafre (*Spinacea oleracea* L.) pertence à família das Quenopodiáceas e ao gênero *Spinacea*, incluindo três a quatro espécies herbáceas originárias do sudoeste asiático (Almeida, 2006).

A *Spinacea oleracea* L. (figura 1.9) é uma planta anual, dioica e apresenta polinização anemófila (Flora Ibérica, 2016).



Figura 1.9 - Ilustração de *Spinacea oleracea*: (a) pé de flores femininas; (b) ramo com inflorescências masculinas; (c) porção da haste de plantas femininas; (d) flor feminina; (e) flor feminina mostrando o ovário; (f) flor masculina; (g) fruto (Adaptada de Flora Ibérica, 2016).



Esta apresenta um sistema radicular aprumado, pouco ramificado e superficial. As folhas dispostas em roseta são pecioladas e têm o limbo de forma ovada, alongada ou pontiaguda (figura 1.9). Nas folhas completamente expandidas o comprimento dos pecíolos é semelhante ao do limbo, mas diminui progressivamente das folhas mais velhas para as mais jovens. A superfície do limbo pode ser lisa ou apresentar rugosidades bolbosas semelhantes às da couve-lombarda. O fruto desta planta é um utrículo, seco e indeiscente, e monospérmico, sendo apenas utilizado como semente, podendo ser lisas e redondas ou espinhosas e irregulares (Morelock & Correll, 2008; Flora Ibérica, 2016).

A germinação ótima destas sementes ocorre cerca de 7 dias após sementeira, a uma temperatura entre 20 e 25 °C. O espinafre é uma planta de climas frescos, não suportando temperaturas acima de 32 °C, a temperatura ótima de desenvolvimento reside entre 15 e 20 °C (Almeida, 2006).

Consideram-se duas fases de desenvolvimento da planta de espinafre: a fase roseta e a fase reprodutiva. A primeira fase ocorre após o estado de plântula, onde o espinafre adquire uma forma de roseta, com as folhas inseridas num caule muito curto. A fase reprodutiva ocorre em condições específicas, tais como temperaturas superiores a 15 °C e um fotoperíodo de 14 h, para a maior parte das cultivares. Esta fase é caracterizada pelo aparecimento de inflorescências. Na fase de roseta a planta atinge uma altura de 15 a 25 cm, mas a haste floral pode atingir os 80 cm (Almeida, 2006; Morelock & Correll, 2008).

O espinafre adapta-se melhor a solos frescos e húmidos, com constante disponibilidade de água no solo. A alternância de períodos de abundância e défice de água favorece o espigamento. Pelo facto do sistema radicular do espinafre ser superficial, explora um volume reduzido do solo, exigindo por isso regas frequentes, sendo a rega por aspersão a mais adequada para esta cultura (Almeida, 2006; Flora Ibérica, 2016). O espinafre desenvolve-se mal em solos compactos e ácidos, tendo como intervalo ótimo de pH 6,0 a 7,5 (Morelock & Correll, 2008). A tolerância à salinidade é considerada elevada, desenvolvendo-se sem quebra de produção em solos com uma condutividade até 2,0 mS m⁻¹ (Almeida, 2006).

É uma planta nutricionalmente exigente, o azoto (N) deve ser adicionado fracionado, cerca de 50 % em adubação de fundo e o restante repartido em uma ou duas coberturas (Almeida, 2006). Para uma produtividade de 83 t ha⁻¹, devem ser adicionados 91 kg N ha⁻¹, 27 kg P₂O₅ ha⁻¹, 233 kg K₂O ha⁻¹, 23 kg CaO ha⁻¹ e 20 kg MgO ha⁻¹.

A colheita da planta realiza-se quando esta apresenta o tamanho desejado, normalmente entre 40 a 60 dias de crescimento (Almeida, 2006). Uma boa produção apresentará níveis de macro e micronutrientes em folhas próximos dos apresentados na tabela 1.4.

Tabela 1.4 - Níveis de nutrientes considerados adequados na análise foliar 30 dias após sementeira, expressos em percentagem (%) ou partes por milhão (ppm) (Almeida, 2006).

Macronutrientes (%)					
Azoto (N)	Fosforo (P)	Potássio (K)	Cálcio (Ca)	Magnésio (Mg)	Enxofre (S)
3,0 – 4,5	0,3 – 0,5	3,0 – 4,0	0,6 – 1,0	1,0 -1,6	-
Micronutrientes (ppm)					
Ferro (Fe)	Manganês (Mn)	Zinco (Zn)	Boro (B)	Cobre (Cu)	Molibdénio (Mo)
-	50 – 100	50 - 70	20 - 40	5 - 7	0,1 – 1,0

De entre os elementos apresentados, podem-se destacar os que fazem parte de compostos de carbono (N e S), os que são importantes para o armazenamento de energia ou integridade estrutural (P e B), os que se mantêm na forma iónica (K, Ca, Mg e Mn) e os que se envolvem em reações redox (Fe, Zn, Cu e Mo).

O azoto é o elemento necessário em quantidades superiores, para plantas. Este é constituinte de diversos componentes das células, como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleótidos, coenzimas e hexoaminas (Taiz & Zeiger, 2002). A deficiência deste elemento pode rapidamente inibir o crescimento da planta, bem como, caso persista, provocar cloroses principalmente nas folhas mais velhas (Varennnes, 2003). Quando existe carência de azoto, pode existir a acumulação de glúcidos que conseqüentemente podem ser utilizados na síntese de antocianinas, provocando a acumulação deste pigmento, que em algumas espécies se reflete numa coloração purpura em folhas e pecíolos (Taiz & Zeiger, 2002).

O enxofre é encontrado em dois aminoácidos e é um constituinte de várias coenzimas e vitaminas essenciais para o metabolismo (Taiz & Zeiger, 2002). Muitos dos sintomas de deficiência de enxofre são semelhantes aos da deficiência de azoto, devido a serem ambos constituintes de proteínas e a sua deficiência afeta mais a parte aérea do que as raízes (Varennnes, 2003). Entre estes sintomas incluem-se cloroses, nanismo de crescimento e a acumulação de antocianinas. Contudo as cloroses por carência de enxofre surgem tanto em folhas velhas como jovens, devido à difícil mobilização de S de folhas velhas para jovens (Hawkesford *et al.*, 2006).



O fósforo (como fosfato, PO_4^{3-}) é um constituinte de compostos importantes de células de plantas, incluindo os intermediários de respiração celular e da fotossíntese, e os fosfolípidos que constituem as membranas celulares das plantas. É também um componente de nucleótidos utilizados no metabolismo da energia da planta (como o ATP) e no ADN e ARN. Os sintomas característicos de deficiência de fósforo incluem crescimento atrofiado em plantas jovens, uma coloração das folhas verde escura e aparecimento de manchas necróticas nas folhas (Taiz & Zeiger, 2002). Tal como na carência de azoto, algumas espécies podem produzir um excesso de antocianinas, desenvolvendo uma ligeira coloração púrpura (Schachtman *et al.*, 1998).

Embora a função exata do boro (B) no metabolismo das plantas não seja clara, pensa-se que está relacionado com o alongamento celular, síntese de ácidos nucleicos, respostas hormonais e funções da membrana. A carência em B pode causar uma ampla variedade de sintomas, dependendo da espécie e da idade da planta. Um sintoma característico é a necrose negra, de folhas jovens e brotos terminais (devido à inibição da divisão celular). Hastes duras e invulgarmente quebradiças, planta mais ramificada, bem como necroses e mal formações em frutos, raízes e tubérculos são outros sintomas que podem ser observados perante a deficiência de boro (Bolanos *et al.*, 2004).

O potássio (K), desempenha um papel importante na regulação do potencial osmótico das células da planta e ativa várias enzimas envolvidas na respiração e fotossíntese. O primeiro sintoma observável de deficiência de potássio são cloroses malhadas ou marginais em folhas maduras, seguidas de necroses nas pontas das folhas, margens e entre veias (Mengel, 2007). A deficiência em K pode também provocar maior suscetibilidade das raízes a fungos e enfraquecimento das hastes, e torna as plantas menos resistentes à falta de água (Varennnes, 2003).

O cálcio é utilizado na síntese de novas paredes celulares, particularmente as lamelas que separam células recém-divididas, é também utilizado no fuso mitótico durante a divisão celular, sendo necessário para o normal funcionamento de membranas celulares das plantas (Hirschi, 2004). Os sintomas característicos da deficiência de cálcio incluem necroses nas pontas das raízes ou de folhas jovens, onde a divisão celular e a formação de paredes são mais rápidas; deformação foliar; raízes acastanhadas, curtas e altamente ramificadas (Taiz & Zeiger, 2002; Varennnes, 2003).

Nas células vegetais, o magnésio tem um papel específico na ativação de enzimas envolvidas na respiração, na fotossíntese, na síntese de ADN e ARN, e é também parte estrutural do anel da clorofila (Taiz & Zeiger, 2002). A deficiência de Mg reflete-se em cloroses entre as nervuras,

sendo observada inicialmente em folhas velhas, devido à mobilidade deste elemento (Varennnes, 2003). A extensão da deficiência pode levar à transformação da tonalidade amarela em branca e à abscisão prematura das folhas (Shaul, 2002).

O manganês é, também, responsável pela ativação de várias enzimas em células vegetais, nomeadamente descarboxilases e desidrogenases envolvidas no ciclo de Krebs. O principal sintoma de deficiência de manganês são cloroses entre nervuras, associadas ao desenvolvimento de pequenas manchas necróticas (Millaleo *et al.*, 2010).

O ferro tem um papel importante como componente de enzimas envolvidas na transferência de eletrões (reações redox), tais como os citocromos (Taiz & Zeiger, 2002). Tal como a deficiência em Mg, um sintoma característico da deficiência em Fe é a clorose entre nervuras, contudo aparece primeiro em folhas mais jovens, pois o Fe não pode ser prontamente mobilizado a partir de folhas mais velhas (Varennnes, 2003). Em condições de extrema deficiência ou deficiência prolongada, as veias também podem tornar-se cloróticas, fazendo com que toda a folha se torne branca (Kobayashi & Nishizawa, 2012).

Muitas enzimas requerem o zinco para a sua atividade, além de ser necessário para a biossíntese de clorofila em algumas plantas. A deficiência de zinco é caracterizada por uma redução do crescimento entre nós (Varennnes, 2003). As folhas de plantas com deficiência em Zn, também podem ser pequenas e deformadas. As cloroses entre nervuras também podem surgir em folhas mais velhas e progredir para manchas necróticas brancas (Broadley *et al.*, 2007).

O cobre tal como o ferro, está associado a enzimas envolvidas em reações redox sendo também reversivelmente oxidado (Taiz & Zeiger, 2002). O sintoma inicial de deficiência de cobre é a produção de folhas verde-escuras, que podem conter manchas necróticas. As manchas necróticas aparecem primeiro nas pontas das folhas jovens e, em seguida, estendem-se em direção à base da folha ao longo das margens. As folhas também podem ter deformações e apresentar abscisão prematura (Maksymiec, 1997).

O molibdénio (Mo) é um componente de várias enzimas, incluindo a nitrato-redutase (catalisa a redução de nitrato para nitrito durante a sua assimilação pela planta) e a nitrogenase (converte o azoto em amónia) (Taiz & Zeiger, 2002). A deficiência em Mo pode resultar por isso, na deficiência em N (Varennnes, 2003). A primeira indicação de uma deficiência de molibdénio é clorose geral entre veias e necrose das folhas mais velhas. A formação de flores pode ser impedida, ou as flores podem sofrer de abscisão prematura (Kaiser *et al.*, 2005).



O espinafre é cultivado pelas suas folhas, sendo consumidas em fresco ou processadas (congeladas, enlatas, cozinhadas). As folhas de espinafre apresentam elevadas concentrações de ácido ascórbico, vitamina A, α -tocoferol, carotenóides (principalmente luteína) e folatos. O espinafre é considerado uma boa fonte de antioxidantes e tem uma das mais altas capacidades de acumulação de radicais de oxigénio, quando comparado com outros vegetais (Morelock & Correll, 2008). É também conhecido pelo seu considerável teor de ferro e de cálcio, quando comparado com outros vegetais de folha. Na tabela 1.5 está presente a composição nutricional média da planta de espinafre.

Tabela 1.5 - Composição nutricional média da planta de espinafre, por 100 g de parte comestível (adaptado de Almeida, 2006).

Valor nutricional					
Água (%)	Energia (kcal)	Proteína (%)	Gordura (%)	Glúcidos (%)	Fibra (%)
92,0	23,0	2,9	0,4	3,6	2,2
Vitaminas					
Vitamina A (UI)	Tiamina (mg)	Riboflavina (mg)	Niacina (mg)	Ác. ascórbico (mg)	Vitamina B6 (mg)
9377	0,078	0,189	0,724	28,100	0,195
Elementos químicos					
Potássio - K (mg)	Cálcio - Ca (mg)	Fosforo - P (mg)	Magnésio - Mg (mg)	Sódio - Na (mg)	Ferro - Fe (mg)
558,0	99,0	49,0	79,0	79,0	2,7

Contudo esta planta acumula ácido oxálico, um composto anti nutricional que pode reduzir a biodisponibilidade de alguns minerais (Fe, Mg e Ca). Quando consumido em excesso este composto pode ter efeitos indesejáveis na saúde por formação de compostos como oxalato de cálcio e oxalato de ferro (Almeida, 2006).

Dependendo das condições de crescimento, os espinafres são, tal como outros vegetais de folha, acumuladores de azoto na forma nítrica que pode ser reduzido a nitritos e originar nitrosaminas que são compostos tóxicos e carcinogénicos. A redução de nitratos em nitritos nos organismos interfere negativamente com a regeneração da oxi-hemoglobina que contem Fe^{2+} a partir da meta-hemoglobina. Na presença de quantidades elevadas de azoto em forma nítrica, a meta-hemoglobina (que contém Fe^{3+}) permanece em quantidades mais elevadas, mas esta forma é incapaz de se ligar ao oxigénio, podendo causar deficiência no processo de

transporte de oxigénio às células, causando meta-hemoglobinemia em bebés, designada doença-azul (Shokrzadeh *et al.*, 2007).

O espinafre, introduzido na Península Ibérica no século XI pelos árabes, é uma planta largamente consumida devido ao seu elevado valor nutricional (Nishihara *et al.*, 2001; Morelock & Correll, 2008; Citak & Sonmez, 2010). A crescente preocupação nutricional e o recente desenvolvimento da comercialização de *baby leaf*, tem sido responsável pelo aumento do consumo de espinafre (Morelock & Correll, 2008). Em 2007 a FAO considerou esta planta como a segunda cultura de folha mais importante, com uma produção mundial de 14.044.816 ton, em 2014 a produção mundial atingiu as 46.385.031 ton (Citak & Sonmez, 2010).

Vários autores referem que a planta do espinafre apresenta uma elevada capacidade acumulativa de Cd, acumulando níveis superiores a 0,2 mg.kg⁻¹ MF (Kuboi *et al.*, 1986; Bingham *et al.*, 1975; Bradford *et al.*, 1975; Davis & Carlton-Smith, 1980; Sinha *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2016; Atkinson *et al.*, 2012). A maioria dos autores estudam a influência de fatores externos na absorção de Cd pela planta de espinafre, mas ainda pouco se sabe sobre a capacidade acumulativa e de defesa da planta e por que razão o espinafre consegue acumular teores elevados de Cd e outros metais pesados.

Capítulo II

Material e Métodos

Capítulo II – Material e Métodos

Neste capítulo serão apresentadas todas as metodologias utilizadas não só para a produção de plantas para as diversas modalidades de ensaio efetuadas, como também as metodologias analíticas efetuadas, tanto para solos como para os materiais vegetais estudados.

Os pontos e subpontos inseridos neste capítulo serão referidos nos capítulos seguintes, incluindo os procedimentos experimentais específicos e as metodologias analíticas utilizadas, de cada ensaio.

2.1. Produção de plantas

A produção de plantas de espinafre utilizadas neste trabalho decorreu nas instalações do Horto de Química Agrícola, do Centro de Investigação em Agronomia, Alimentos, Ambiente e Paisagem (LEAF) do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Na execução dos diferentes ensaios, foram utilizados diversos espaços, uma estufa exterior com regulação semiautomática de temperatura (figura 2.1a), uma câmara de crescimento com controlo automático das condições de crescimento (*AraLab*, figura 2.1b) e uma sala de crescimento com temperatura, humidade e intensidade luminosa controladas (figura 2.1c).

A estufa exterior foi usada para o ensaio em solo artificialmente contaminado com Cd (2.1.4.), descrito no Cap.VI desta tese. Na câmara de crescimento (*AraLab*) realizou-se o ensaio de resposta metabólica ao efeito tóxico de Cd (2.1.3.), descrito no Cap.V. A sala de crescimento foi usada para os ensaios referidos nos Cap.III e IV (2.1.1. e 2.1.2.).

O processo de germinação de plantas foi idêntico para todos os ensaios (figura 2.2). Nesta fase utilizaram-se cilindros de substrato *Jiffy*, previamente hidratados com água desionizada a cerca de 50 °C. Em cada cilindro foram colocadas 5 a 6 sementes, e os cilindros semeados foram mantidos a temperaturas entre 20 °C e 25 °C, humidade relativa de 65 % e um fotoperíodo de 12 h, sendo regularmente hidratados com água desionizada.

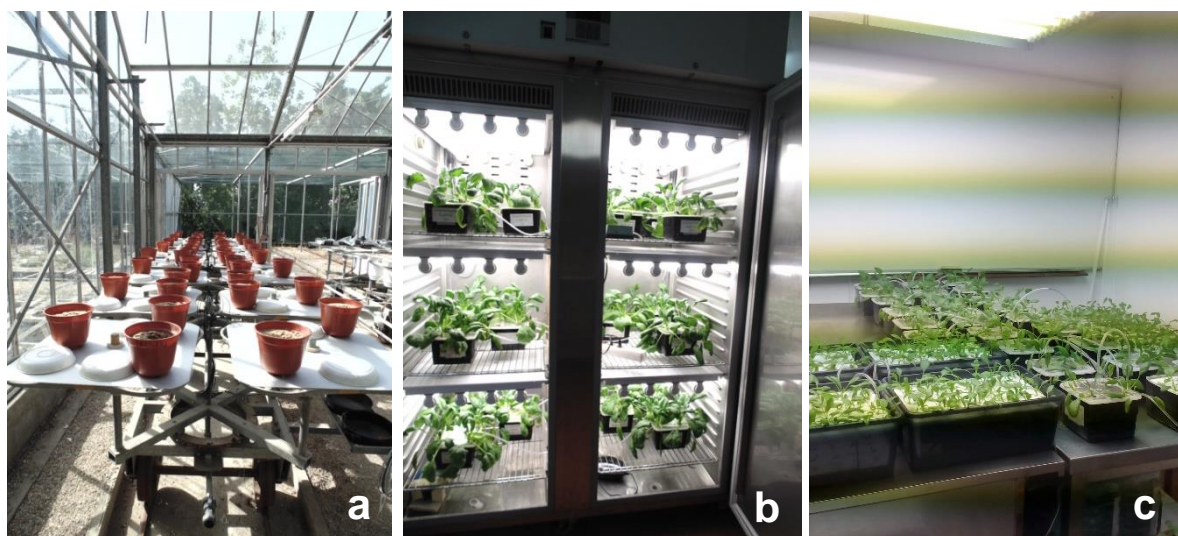


Figura 2.1 - Imagens de instalações do Horto de Química Agrícola do Instituto Superior de Agronomia, estufa exterior (a), camara de crescimento *AraLab* (b) e a sala de crescimento (c).

As sementes de espinafre utilizadas, da variedade *viroflay*, apresentaram, ao longo de todo o período dos diversos ensaios, uma taxa de germinação média de aproximadamente 70 %.

O tempo de crescimento nestas condições foi variável em função do tipo de ensaio, entre 15 e 35 dias após sementeira, permitindo obter plântulas com 2 a 6 folhas. Após atingirem o estado de desenvolvimento previsto, as plântulas, foram transferidas ou para os recipientes de solução nutritiva ou para o solo (figura 2.2).

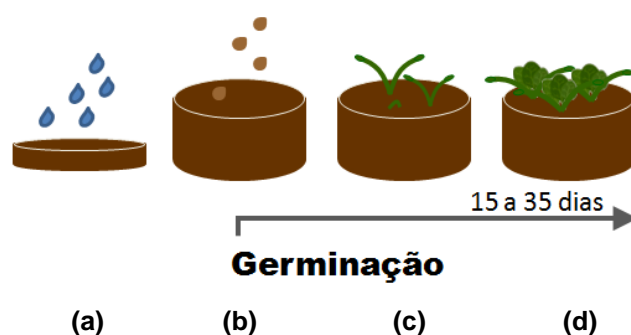


Figura 2.2 - Representação esquemática da fase de germinação, comum a todos os ensaios realizados. (a) hidratação; (b) sementeira; (c) germinação; (d) crescimento prévio à transplantação, o qual é variável com o tipo de ensaio.

Nos ensaios em solo, após a fase de germinação, a plântula foi de imediato sujeita a contaminação. Nos ensaios em solução nutritiva, após germinação as plântulas foram numa primeira fase transferidas para tabuleiros com solução de Hoagland modificada (tabela 2.1), e arejamento forçado, a fim de atingirem um estado de desenvolvimento mais adequado à contaminação a efetuar (para as condições dos ensaios que foram realizados). O pH da solução nutritiva foi regularmente monitorizado em todos os ensaios, e apresentou valores entre 5,7 e 6,6.

Tabela 2.1 - Composição da solução nutritiva (solução Hoagland modificada) com as respetivas concentrações de cada nutriente.

Macronutrientes		Micronutrientes	
Azoto (N)	18,16 mM	Manganês (Mn)	100 µM
Potássio (K)	7,00 mM	Boro (B)	100 µM
Cálcio (Ca)	6,00 mM	Ferro (Fe)	81,7 µM
Enxofre (S)	2,63 mM	Zinco (Zn)	30,0 µM
Magnésio (Mg)	2,50 mM	Molibdénio (Mo)	1,00 µM
Fósforo (P)	1,00 mM	Cobalto (Co)	0,10 µM
		Cobre (Cu)	0,10 µM

A contaminação dos meios de crescimento com cádmio, foi efetuada pela aplicação de soluções *stock* de cloreto de cádmio (CdCl_2). A contaminação ocorreu em diferentes estados de desenvolvimentos da planta e em condições de crescimento variáveis. Nos pontos seguintes estão descritas as condições em que decorreu cada um dos ensaios efetuados: Ensaio de curta duração de acumulação de Cd (2.1.1.); Ensaio de avaliação da capacidade de acumulação de Cd (2.1.2.); Ensaio de resposta metabólica ao efeito tóxico de Cd (2.1.3.) e Ensaio em solo artificialmente contaminado com Cd (2.1.4.).

2.1.1. Ensaio de curta duração de acumulação de Cd

Neste ensaio, pretende-se avaliar a resposta da planta a uma contaminação num período curto, neste caso, em 24 horas. Foram usadas plântulas com 15 dias de crescimento após germinação, que foram transferidas para a solução nutritiva referida na tabela 2.1 e com arejamento forçado, onde permaneceram 25 dias para aclimação ao meio, assegurando-se

a renovação semanal da solução nutritiva. Este ensaio decorreu na sala de crescimento, com condições de temperatura entre os 16 e 20 °C, humidade relativa de 68 % e um fotoperíodo de 12 h. Após este período (25 dias), foi adicionado Cd à solução nutritiva, a partir da solução *stock* de forma a obter as concentrações finais utilizadas neste ensaio, 25 μM e 50 μM .

Foram colhidas 5 a 6 plantas de cada modalidade de contaminação com 25 e 50 μM de Cd, em diferentes tempos de exposição ao Cd: 0; 0,5; 1; 2; 3; 6; 12 e 24 h. Este material vegetal foi colhido segundo a metodologia descrita em 2.2.1. (para material seco), para a determinação da concentração de Cd em folhas, pecíolos e raízes pelo método descrito em 2.3.1.

Os resultados deste ensaio foram tratados estatisticamente como descrito em 2.5. e serão apresentados e discutidos no Cap.III.

Na figura 2.3 está representado o esquema das fases deste ensaio. Como modalidade controlo, foram consideradas amostras retiradas no tempo zero, isto é, antes da adição de Cd.

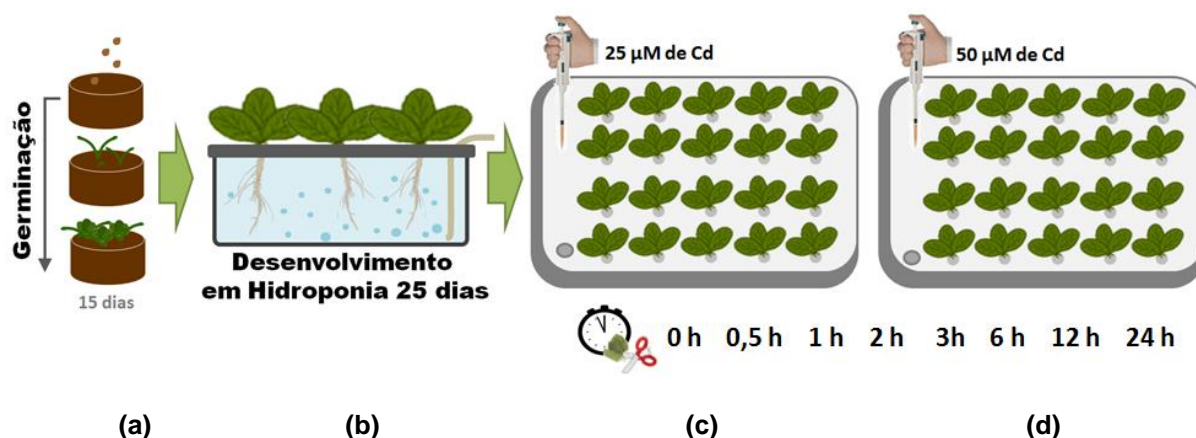


Figura 2.3 - Representação esquemática do ensaio de curta duração de acumulação de Cd; (a) fase de germinação, durante 15 dias; (b) 25 dias de crescimento em solução nutritiva; (c) e (d) contaminação com 25 e 50 μM de Cd, respetivamente, e tempos de colheita de amostras.

2.1.2. Ensaio de avaliação da capacidade de acumulação de Cd

Neste ensaio, pretende-se avaliar a absorção de Cd pela planta, ao longo do tempo, em função da contaminação com Cd em diferentes concentrações. Pretende-se ainda caracterizar o processo de acumulação de Cd nas folhas, pecíolos e raízes de plantas em relação ao seu estado de desenvolvimento, definido como plantas jovens e plantas adultas, da seguinte forma:

- i) plantas jovens (plantas com 30 dias de crescimento antes da contaminação, isto é, 15 dias em substrato e 15 dias em solução nutritiva);
- ii) plantas adultas (plantas com 70 dias de crescimento antes da contaminação, isto é, 15 dias em substrato e 55 dias em solução nutritiva).

Para o ensaio foram utilizadas plântulas com 15 dias de crescimento após germinação, que foram transferidas para a solução nutritiva referida na tabela 2.1, com arejamento forçado, assegurando uma renovação semanal da solução nutritiva.

Para o estudo da acumulação de Cd pela planta, foi efetuada a contaminação de plantas com os estados de desenvolvimento referidos anteriormente, designadas por plantas jovens e plantas adultas. O processo encontra-se representado na figura 2.4.

As plantas foram mantidas entre os 16 e os 20 °C, humidade relativa de 68 % e um fotoperíodo de 12 h, na sala de crescimento.

O Cd foi adicionado à solução nutritiva a partir da solução *stock* de CdCl_2 , obtendo-se as concentrações finais de cádmio de 5 μM ; 10 μM ; 25 μM ; 50 μM e 100 μM . Foi preparada nas mesmas condições, uma modalidade controlo, à qual não foi adicionado Cd. Para cada modalidade de crescimento, isto é, plantas jovens e adultas e para as diferentes concentrações de cádmio, foram colhidas 5 a 8 plantas aos dias 0, 2, 6, 13, 17 e 21 de exposição ao Cd, segundo o procedimento descrito em 2.2.1.

Estas amostras foram utilizadas para a determinação de alguns parâmetros vegetativos, como a dimensão e peso da parte aérea e raiz e o valor de clorofila pelo método não destrutivo (2.3.2.1.) e também para as restantes determinações da concentração de cádmio em folhas, pecíolos e raiz (2.3.1.).

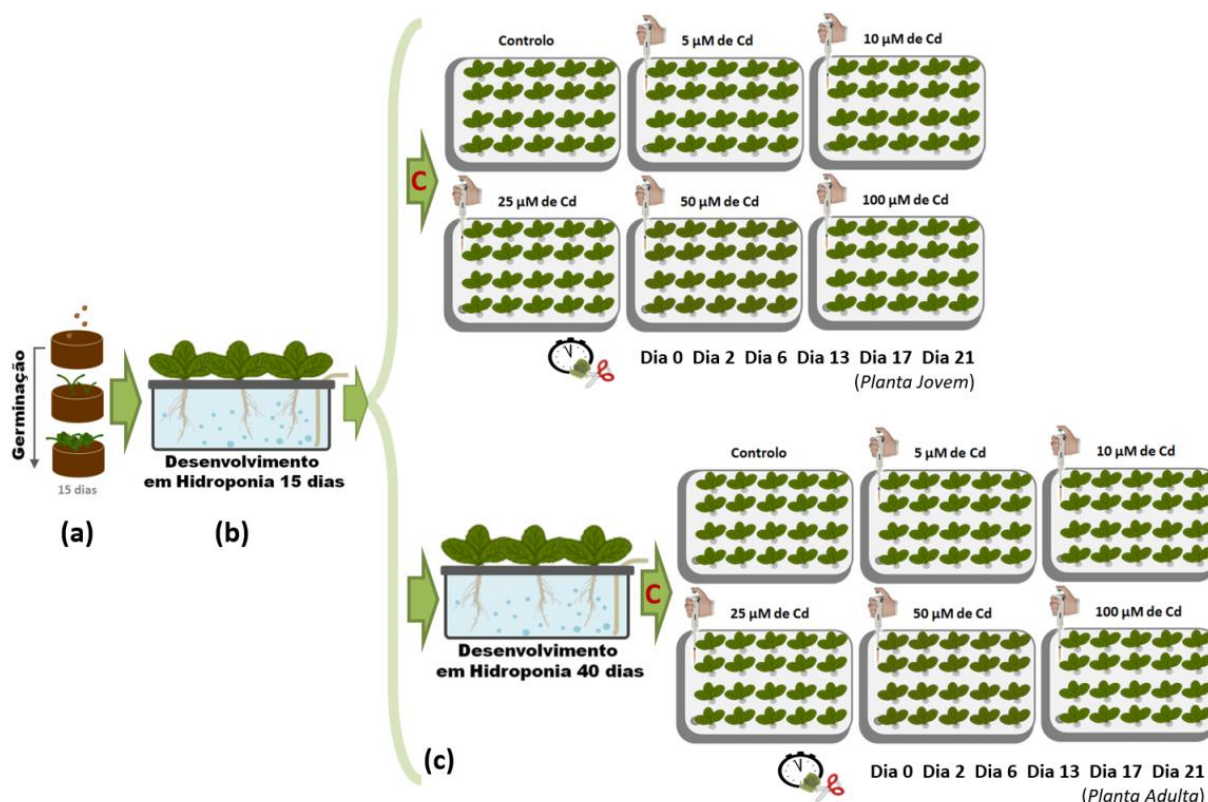


Figura 2.4 - Representação esquemática do ensaio de avaliação da capacidade de acumulação de Cd. (a) 15 dias para a fase de germinação; (b) 15 dias de crescimento em solução nutritiva; (c) contaminação das amostras das modalidades de crescimento plantas jovens e plantas adultas com 5, 10, 25, 50 e 100 µM de Cd.

Com os dados deste ensaio, calculam-se os índices de tolerância (IT) para alguns dos parâmetros vegetativos em estudo, o qual permite a comparação de cada parâmetro com o controle. Este foi obtido pela fração entre valor de cada parâmetro da planta contaminada e o valor médio do parâmetro da planta controle:

$$IT = \frac{V_{\text{contaminada}}}{V_{\text{controle}}}$$

quando este é inferior a 1 significa que o Cd levou à diminuição desse parâmetro, quando é superior a 1, significa que existiu um estímulo desse parâmetro. Através das determinações de cádmio foram ainda efetuadas curvas descrevendo a acumulação de Cd nas folhas, pecíolos e raízes.

Os resultados deste ensaio são apresentados no Cap.IV e tratados estatisticamente segundo descrito em 2.5.



2.1.3. Ensaio de resposta metabólica ao efeito tóxico de Cd

Este ensaio foi conduzido em condições semelhantes ao ensaio anterior, em que a contaminação foi também efetuada em plantas jovens e plantas adultas, mas em que apenas foram utilizadas 2 concentrações de Cd, 25 e 50 μM e destinou-se à realização de determinações analíticas que não foram possíveis de concretizar no ensaio anterior, designadamente pelo elevado número de amostras que requeria, e pela impossibilidade de produzir uma maior quantidade de plantas simultaneamente.

Foi considerado que a caracterização do processo de acumulação de cádmio se encontra efetuada no ensaio anterior, pelo que neste ensaio se pretende complementar a caracterização da resposta metabólica das plantas à contaminação com Cd através da determinação de outros parâmetros analíticos referentes às alterações metabólicas resultantes do stresse induzido pelos meios contaminados.

Após a germinação, as plantas foram transferidas para solução nutritiva de composição descrita na tabela 2.1 e com arejamento forçado. As plantas foram mantidas na câmara de crescimento *AraLab*, a temperaturas diurnas de 20 °C, temperaturas noturnas de 16 °C, humidade relativa de 68 %, um fotoperíodo de 12 h e uma radiação média incidente de 50 % que corresponde a uma intensidade luminosa teórica de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Neste ensaio foi assegurada uma renovação semanal da solução nutritiva, e foi registada uma variação de pH de 6 a 6,7, ao longo do ensaio. Um esquema do delineamento deste ensaio encontra-se na figura 2.5.

A contaminação da solução nutritiva foi efetuada com 25 e 50 μM de Cd, usando uma modalidade não contaminada como controlo; foram efetuadas colheitas aos dias 0, 2, 7 e 14 para determinações com material seco (como os ensaios referidos anteriormente) e material fresco. O material fresco foi utilizado para determinação da concentração de clorofilas e carotenoides (2.3.2.), de ascorbato (2.3.3.), de prolina total (2.3.4.), de peróxido de hidrogénio (2.3.8.) e para a determinação da peroxidação lipídica (2.3.9.) e da atividade enzimática de diferentes enzimas (2.3.7.). O material fresco de plantas adultas permitiu também a determinação de fitoquelatinas e glutatona reduzida (2.3.5.) e ácidos orgânicos (2.3.6.) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Os dados obtidos com este ensaio foram tratados estatisticamente como descrito em 2.5. e serão apresentados no Cap.V, bem como a sua discussão.

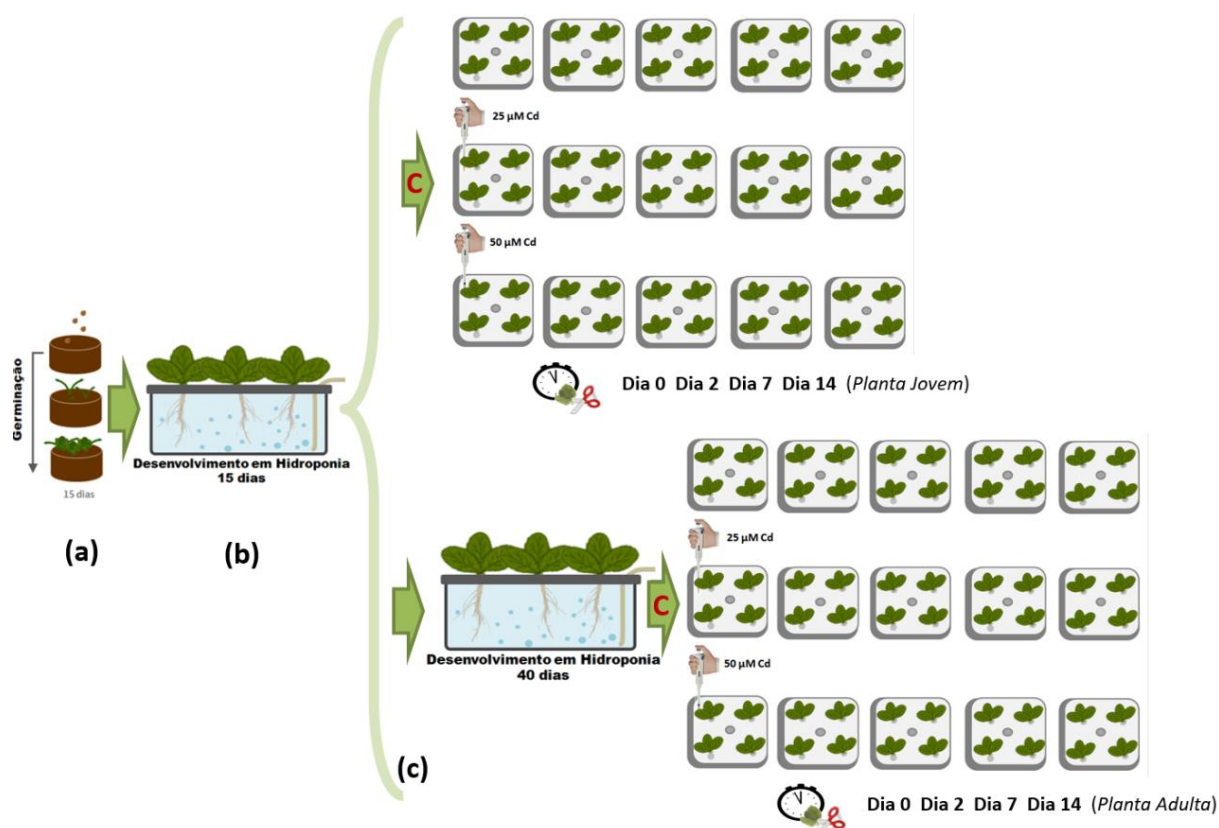


Figura 2.5 - Representação esquemática do ensaio de resposta metabólica ao afeito tóxico de Cd. (a) 15 dias para a fase de germinação; (b) 15 dias de crescimento em solução nutritiva sem contaminação; (c) contaminação das amostras das modalidades de crescimento plantas jovens e plantas adultas, com 25 e 50 µM de Cd.

2.1.4. Ensaio em solo artificialmente contaminado com Cd

Este ensaio foi realizado com solo contaminado artificialmente pela adição de Cd na forma de solução de CdCl_2 . Para esse efeito foi utilizado cerca de 100 kg de solo arenoso, com a composição indicada na tabela 2.2, que foram divididos em três conjuntos diferentes. A dois desses conjuntos foi adicionado Cd na forma de solução de CdCl_2 de modo a obter um solo com 2 mg Cd kg^{-1} de solo e outro com 10 mg kg^{-1} . Os três conjuntos de solo foram mantidos sem cultura durante cerca de um ano, para que se obtivesse uma estabilização das formas minerais incorporadas, sendo semanalmente hidratados sem exceder 50 % da capacidade de campo (evitando a lixiviação). Duas semanas antes de iniciar o ensaio os solos foram distribuídos por vasos e simultaneamente foi aplicado chorume bovino (CB) em quatro quantidades distintas (0 %; 2,5 %; 5 % e 10 %).

Tabela 2.2 - Análise elementar do solo primário (areia) utilizado neste ensaio.

pH		Matéria Orgânica	Textura	N – NH ₄ ⁺	N – NO ₃ ⁻	K (K ₂ O)	P (P ₂ O ₅)
H ₂ O	KCl	(%)		(mg kg ⁻¹)		(mg kg ⁻¹)	
5,67 ± 0,09	5,05 ± 0,10	< 0.01	arenoso	nd	nd	5	5

nd- não detetado (abaixo do limite de deteção)

A capacidade máxima de retenção de água ou capacidade de campo foi determinada antes e depois da aplicação de CB. Esta baseia-se na determinação da quantidade de água que um solo é capaz de reter, e foi determinada através de absorção por capilaridade durante 24 h obtendo-se massa do solo mais água (M_{S+A}) e subsequente secagem a 105 °C com ventilação durante 24 h resultando a massa do solo (M_S), utilizando 3 repetições. Por diferença entre a M_{S+A} e a M_S obtém-se a quantidade de água que esse solo tem capacidade de reter.

Foi efetuada uma sementeira de espinafres em cilindros de substrato *Jiffy*, como descrito em 2.1. As plantas mantiveram-se em cilindros de substrato durante 35 dias. A plantação foi feita retirando o excedente de substrato e colocando 3 plantas por vaso. Os vasos foram regularmente hidratados, não excedendo 70 % da capacidade de campo.

A adubação foi realizada em 3 frações: antes da plantação e passados 26 e 33 dias, com a totalidade de 36,10 mg potássio (K) kg⁻¹ de solo (adicionado sob a forma de nitrato de potássio – KNO₃), 4,09 mg fosforo (P) kg⁻¹ de solo (adicionado sob a forma de fosfato de potássio monobásico - KH₂PO₄) e 33,28 mg de azoto (N) kg⁻¹ de solo (adicionado sob a forma de KNO₃ e nitrato de cálcio – Ca(NO₃)₂).

Setenta dias após a germinação, ou seja 35 dias após a contaminação, foi realizada a colheita de plantas (segundo a metodologia 2.2.1.) para determinação da concentração de Cd e elementos essenciais em folhas e raízes (2.3.1.). Além da colheita de plantas colheram-se também amostras de solo para determinações descritas em 2.4.





Com os resultados de biomassa obtidos determinou-se o índice de tolerância (IT), o qual permitiu a comparação entre plantas contaminadas e não contaminadas. Este foi obtido pela fração entre a biomassa da planta contaminada e o valor médio da biomassa da planta controlo:

$$IT = \frac{B_{\text{contaminada}}}{B_{\text{controlo}}}$$

Quando este é inferior a 1 significa que o Cd levou à diminuição da biomassa, quando é superior a 1, significa que existiu um estímulo deste parâmetro.

Os resultados obtidos neste ensaio foram tratados estatisticamente segundo descrito em 2.5. e estão presentes no Cap.VI desta tese.

Figura 2.3 – Quadro resumo com detalhes do delineamento experimental de cada ensaio de produção de plantas.

Denominação	Estado de desenvolvimento	Contaminação e Colheitas	Imagem	Determinações Analíticas
Ensaio de curta duração de acumulação de Cd Capítulo III	40 dias desde a sementeira	Contaminação: 25 μM e 50 μM de Cd Tempos de exposição: 0; 0,5; 1; 2; 3; 6; 12 e 24 h		<ul style="list-style-type: none"> • [Cd] em folhas, pecíolos e raízes (2.3.1)
Ensaio de avaliação da capacidade de acumulação de Cd Capítulo IV	30 dias desde a sementeira ----- 70 dias desde a sementeira	Contaminação: 0; 5; 10; 25; 50 e 100 μM de Cd Tempos de exposição: 0; 2; 6; 13; 17 e 21 dias		<ul style="list-style-type: none"> • Parâmetros vegetativos (comprimento raiz e parte aérea; biomassa total, raiz e parte aérea; concentração de clorofilas - 2.3.2.1) • [Cd] em folhas, pecíolos e raízes (2.3.1)
Ensaio de resposta metabólica ao efeito tóxico de Cd Capítulo V	30 dias desde a sementeira ----- 70 dias desde a sementeira	Contaminação: 0; 25 e 50 μM de Cd Tempos de exposição: 0; 2; 7 e 14 dias		<ul style="list-style-type: none"> • [Cd] em folhas, pecíolos e raízes (2.3.1) • Concentração de Ca, Mg, Fe, Cu, Na, K, Zn e Mn em folhas caules e pecíolos (2.3.1) • [clorofilas] (2.3.2) • [carotenoides] (2.3.3) • [ascorbato] em folhas (2.3.4) • [prolina] em folhas (2.3.5) • [H₂O₂] em folhas e raízes (2.3.9) • Peroxidação dos Lipídios em folhas e raízes (2.3.10) • Atividade enzimática em folhas e raízes (2.3.8) • [PC] e [GSH] em folhas e raízes (2.3.5) • [AO] em folhas e raízes (2.3.6)
Ensaio em Solo Cd Capítulo VI	35 dias desde a sementeira	Contaminação: 0; 2 e 10 mg de Cd kg ⁻¹ Aplicação de CS: 0; 2,5; 5; 10 % Tempo de exposição: 35 dias		<ul style="list-style-type: none"> • [Cd] em folhas, pecíolos e raízes (2.3.1) • Concentração de Ca, Mg, Fe, Cu, Na, K, Zn e Mn em folhas caules e pecíolos (2.3.1) • pH e condutividade elétrica dos solos (2.4.1) • Concentração de elementos químicos no solo (2.4.2) • Carbono orgânico total (2.4.3) • Caracterização do CB (2.4.5)

2.2. Colheita e conservação de amostras

Em todos os ensaios anteriormente descritos é necessária a recolha de amostras de materiais vegetais e/ou de solos. Dependendo das determinações analíticas a efetuar, as amostras são secas ou congeladas de imediato em azoto líquido, e mantidas em camara a -80 °C. Neste subcapítulo são descritos todos os procedimentos usados para os diversos tipos de amostras que foram utilizadas neste trabalho.

2.2.1. Amostras de materiais vegetais

Nas plantas produzidas em solução nutritiva analisaram-se as diferentes partes: parte aérea (folhas e pecíolos) e raiz. Nestas plantas foi efetuada a medição do comprimento total, da parte aérea e da raiz, foi determinada a massa total (biomassa) da parte aérea e da raiz, e também contabilizado o número de folhas. Depois de avaliar estes parâmetros, denominados neste trabalho por parâmetros vegetativos, separaram-se as diferentes partes (folhas, pecíolos e raiz), para as análises efetuadas posteriormente.

Nos ensaios em solo, a parte aérea das plantas foi retirada, medida e pesada, bem como contabilizado o número de folhas, sendo de seguida efetuada a separação das folhas e pecíolos. Posteriormente a raiz foi minuciosamente extraída do solo, de forma a não influenciar as determinações analíticas do solo.

Estes tecidos vegetais foram armazenados após secagem ou congelados em azoto líquido e conservados a -80 °C.

Para a conservação do material vegetal seco, as folhas e os pecíolos foram lavados com água desionizada e secos por centrifugação manual, enquanto que as raízes permaneceram durante 10 min em solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) a 5 mM (de modo a eliminar o Cd adsorvido no exterior da raiz), sendo de seguida lavados com água desionizada e extraído o excedente de água com papel absorvente (Nocito *et al.*, 2002). Estas amostras foram secas em estufa a 60 °C até apresentarem peso constante. A pesagem prévia deste material (massa fresca em g) e após secagem (massa seca em g) permitiu determinar a percentagem de massa seca (% MS), pela seguinte expressão:

$$\% \text{ MS} = \frac{(\text{Massa}_{\text{seca}} \times 100)}{\text{Massa}_{\text{fresca}}}$$

As amostras secas foram moídas num almofariz com pilão e armazenadas em local seco.

Para o material fresco, às folhas foi extraída a nervura principal e os pecíolos e raízes foram cortados em frações menores. Cada um destes tecidos foi armazenado em pacotes de aproximadamente 2 g, imediatamente congelado em azoto líquido e armazenado a -80 °C.

2.2.2. Amostras de solo

O solo utilizado nos ensaios foi analisado antes e após cada ensaio. Após crivado, ou após o ensaio, o solo foi uniformizado e foram recolhidas no mínimo 100 g de amostra seca a 50 °C, em estufa ventilada, durante 3 dias. Com estas amostras foi possível determinar o pH e condutividade do solo (2.4.1.); elementos químicos totais, macro e micro nutrientes extraíveis (2.4.2.); a concentração de carbono (C) total (2.4.3.) e a concentração de NPK do solo (2.4.4.).

2.3. Determinações analíticas em materiais vegetais

2.3.1. Determinação da concentração de elementos químicos

Os elementos analisados foram Cd, Ca, Mg, K, Na, Fe, Cu, Zn e Mn, por espectrofotometria de absorção atômica (EAA) utilizando o método descrito por Pinto *et al.* (2016).

A espectrofotometria de absorção atômica trata o estudo da absorção da radiação nas zonas do visível e ultravioleta (UV-Vis de 190 a 800 nm) por átomos (Skoog, 2007). Quando uma solução é transportada para uma chama ou aquecida num tubo de grafite a temperatura elevada, ela é vaporizada formando-se uma nuvem de elementos no estado atômico dentro da chama ou do tubo de grafite. Essa nuvem vai ser atravessada por um feixe de energia radiante de comprimento de onda apropriado (específico para o elemento a quantificar) e a quantidade de radiação que vai ser absorvida vai ser proporcional ao número de espécies atômicas existentes.

Para obter a fração elementar das amostras foi efetuada uma digestão das amostras utilizando um equipamento micro-ondas *CEM MDS – 2000*, ou o digestor *DigiPREP MS*.

Para efetuar a digestão de tecidos vegetais em microondas *CEM MDS – 2000*, foi efetuada uma pesagem de 0,5 g de amostra seca, em triplicado, para tubos de *teflon* seguida da adição de 5 mL de ácido nítrico (HNO₃) concentrado. Devidamente fechados, estes tubos, foram

ligados ao digestor submetendo-os a microondas sob elevadas temperaturas e pressões durante cerca de 45 min, de modo a permitir a digestão rápida de toda a matéria orgânica libertando dióxido de carbono e vapor de água.

A digestão de tecidos vegetais em *DigiPREP MS*, obteve-se por pesagem em triplicado, de 0,5 g de amostra seca para tubos de digestão e adição de 7,5 mL de HNO₃ e 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrados. Os tubos mantiveram-se a 90 °C durante cerca de 20 min, seguindo-se um novo patamar a 105 °C durante 30 min.

Após terminar o processo de digestão ácida e de arrefecidos os tubos à temperatura ambiente, transferiu-se na *hotte* o conteúdo para um balão volumétrico de 25 mL, sendo então o volume completado com água Milli-Q. Os extratos obtidos foram posteriormente utilizados para a determinação destes elementos por EAA em chama ou câmara de grafite, consoante a quantidade presente utilizando um espectrofotómetro de absorção atómica Unicam Solaar M.

Na determinação de cada elemento por EAA foram utilizadas lâmpadas específicas e foram feitas curvas de calibração num intervalo de concentrações adequado à quantidade que se pretendia medir. Na análise de nutrientes foi utilizada a técnica de chama e na análise de Cd foi utilizada a chama ou a câmara de grafite consoante o teor esperado de Cd. Na tabela 2.4 especificam-se as condições de funcionamento da câmara de grafite, tendo-se utilizado um volume de amostra de 20 µL (medidos automaticamente num amostrador automático) e como modificador de matriz, 5 µL de solução a 1 % de paládio (Pd).

Tabela 2.4 - Condições experimentais da câmara de grafite do espectrofotómetro de absorção atómica.
RD – Leitura; TC – Controlo de temperatura

Passo	Fase	Temp. (°C)	Tempo (s)	Rampa de T (°C/s)	Gás	Fluxo de gás (L/min)	Comandos
1	Secagem	100	30	10	Árgon	0,2	-
2	Calcinação	600	20	30		0,2	-
3	Atomização	1000	3	0		0	RD/TC
4	Limpeza	3000	3	0		0,2	TC

Os padrões para as curvas de calibração utilizadas nas análises em câmara de grafite foram preparados diariamente antes de cada análise. Em todas as curvas de calibração utilizadas obteve-se sempre um valor de $R^2 > 0,98$. As leituras de todos os elementos foram

confirmadas pela leitura, intercalada com as amostras, de padrões de concentração conhecida, brancos e extrações de amostras certificadas. Os resultados destas últimas estiveram sempre dentro de um intervalo de $\pm 10 \%$ em relação ao valor certificado.

A concentração de cada elemento presente na amostra é obtida através de curvas padrão para cada elemento analisado, as quais podem ser consultadas na tabela A1 em anexo.

A concentração de cada elemento, tendo em conta a massa da amostra, é expressa em mg kg^{-1} MS.

2.3.2. Determinação de clorofila e carotenoides

2.3.2.1. Clorofila pelo método não destrutivo *Hansatech*

A determinação de clorofila pelo método não destrutivo consistiu na utilização de um leitor portátil de clorofila *Hansatech CL-01*. Este equipamento mede a absorvância em dois comprimentos de onda (620 e 940 nm), convertendo o resultado em teor de clorofila em unidades arbitrárias, designadas unidades *Hansatech*.

A determinação de clorofila com o equipamento *Hansatech* permite avaliar de forma indireta o teor de clorofilas nas folhas, e sendo não destrutivo pode ser efetuado ao longo do crescimento das plantas, nas diversas modalidades, com relativa facilidade. Assim, foi possível obter os teores de clorofila nas folhas, em cada tempo e modalidades nos ensaios descritos em 2.1.1. e 2.1.2. A determinação foi efetuada pelo menos em 3 folhas de 3 plantas, e sempre nos mesmos locais das folhas, em 4 pontos distintos (dois do lado esquerdo da nervura central e dois do lado direito).

Estes valores adimensionais *Hansatech* foram posteriormente convertidos em valores de concentração de clorofila, através da realização de uma curva de correlação entre estas duas medições. Para este efeito, foi efetuada a determinação de clorofila em amostras com uma dimensão definida (com área de leitura correspondente a um diâmetro de 1,27 mm, o equivalente a cerca de 0,06 g de folha registado) de acordo com o método descrito em 2.3.2.2. Esta correlação é descrita pela equação $y = 0,1364x + 1,1865$, em que y corresponde ao valor *Hansatech* e x à concentração de clorofila, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9169.

A determinação de clorofila por espectrofotometria de absorção molecular (EAM) foi efetuada por 2 métodos diferentes, devido a terem sido realizadas em instituições diferentes, pelo que

foram seguidas as metodologias praticadas em cada local. No entanto, apenas para o método referido em 2.3.2.2. foi estabelecida uma correlação com o método *Hansatech*.

2.3.2.2. Clorofila pelo método Sims & Gamon

A determinação da concentração de clorofila realizou-se pelo método adaptado do descrito por Sims & Gamon (2002), utilizando espectrofotometria de absorção molecular (EAM).

O princípio da EAM baseia-se na diminuição da intensidade da radiação incidente de um determinado comprimento de onda do feixe que atravessa uma amostra. Esta medida da quantidade de radiação absorvida é medida pelo espectrofotómetro e designa-se de absorvância. A lei de Lambert-Beer relaciona a absorvância com a concentração, utilizando o coeficiente de absortividade molar (ϵ) específico para a molécula a detetar e o comprimento de onda utilizado, e o comprimento do percurso do feixe de luz na amostra (b – espessura da cuvete) (Harris, 2010).

Os extratos foram obtidos a partir da maceração de cerca de 0,06 g de folhas frescas em 10 mL de solução acetona/Tris (80:20 v/v), a 4 °C. O tampão Tris- HCl, numa concentração de 100 mM e pH de 7,8. Para cada amostra a determinação foi realizada pelo menos em triplicado. O extrato foi centrifugado a 10.000 x g durante 15 min (*Sigma 03-18 K*) e a 4 °C, sendo lida a absorvância do sobrenadante no espectrofotómetro (*AnalyticJena SPECORD 200*) a 470, 537, 647 e 663 nm. Para a conversão de absorvância em concentração de clorofila a, b e total utilizaram-se as equações de Sims & Gamon (2002):

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{mol.mL}^{-1}): 0,01373.A_{663} - 0,000897.A_{537} - 0,003046.A_{647}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{mol.mL}^{-1}): 0,02405.A_{647} - 0,004305.A_{537} - 0,005507.A_{663}$$

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{mol.mL}^{-1}): \text{Clorofila}_a + \text{Clorofila}_b$$

Os resultados foram expressos em função da massa da amostra, $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.



2.3.2.3. Clorofila e Carotenoides pelo método Lichtenthaler

Outro método utilizado para a determinação de clorofila foi adaptado pelo descrito por Lichtenthaler (1987), com um procedimento semelhante ao anterior (2.3.2.2) e utilizando igualmente EAM.

Todo o processo de extração de amostras decorreu a temperaturas entre 0 - 4 °C e com baixa intensidade luminosa. As amostras de folhas frescas foram reduzidas a pó por maceração em azoto líquido. Os extratos foram obtidos por maceração de 0,120 g de folhas frescas em pó, em acetona a 90 %, repousando 30 min no escuro. Os extratos foram centrifugados a 12.000 x *g* durante 10 min (*Sigma 3-30 K*) e o sobrenadante obtido foi filtrado por um filtro *Millipore* 0,45 µm. Foram obtidos 3 extratos de cada amostra.

Para uma cuvete pipetaram-se 200 µL do extrato filtrado, 25 µL de água desionizada e 1194 µL de acetona a 80 %, e determinou-se a absorvância da solução a 663,2 nm; 646,8 nm e 470 nm num EAM (*ThermoSpectronic Unicam-Helios*). O cálculo da concentração da clorofila foi obtido utilizando as formulas descritas por Lichtenthaler & Buschamann (2001):

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g mL}^{-1}): (12,25.A_{663} - 2,79.A_{647})$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g mL}^{-1}): (21,50.A_{647} - 5,10.A_{663})$$

$$\text{Clorofila a+b } (\mu\text{g mL}^{-1}): (7,15.A_{663} + 18,71.A_{647})$$

$$\text{Carotenoides Totais } (\mu\text{g mL}^{-1}): \frac{(1000.A_{470} - 182.\text{Clor}_a - 85,02.\text{Clor}_b)}{198}$$

Os resultados apresentados são expressos tendo em conta a massa da amostra, µg g⁻¹ MF.

2.3.2.4. Determinação de carotenoides por HPLC

Os carotenoides foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*) segundo a metodologia de Ramalho *et al.* (1997).

O sistema de HPLC utilizado é constituído por um amostrador automático, um sistema de distribuição de solvente, uma válvula de injeção de amostra, uma coluna de cromatografia de alta pressão de fase reversa e um detetor de díodos (DAD – *Diode Array Detector*). Todo este sistema encontra-se ligado a um computador que permite controlar parâmetros da

cromatografia e tratar os resultados. Esta técnica utiliza alta pressão para forçar a passagem de eluente através de colunas constituídas por pequenas partículas que permitem obter separações de elevada resolução (Harris, 2010). A eluição da amostra é realizada em função da sua afinidade para com a fase estacionária, e quando eluída e detetada é representada num cromatograma permitindo identificar a molécula (pelo tempo de retenção) e quantificá-la (pela área do pico apresentado).

Para obtenção dos carotenoides foi feito um extrato por maceração de 0,120 g de amostra de folhas frescas reduzidas a pó (em azoto líquido) em acetona a 90 %, permanecendo em repouso no escuro durante 30 min, tendo cada amostra permitido a realização de 3 extratos. Os extratos foram centrifugados a $12.000 \times g$ durante 10 min (*Sigma 3-30 K*) e o sobrenadante obtido foi filtrado por um filtro *Millipore* 0,45 μm . Todo o processo descrito foi executado a menos de 4 °C e com baixa intensidade luminosa.

Do filtrado foram retirados 20 μL , os quais foram injetados no HPLC. A separação foi realizada numa coluna C18 de 5 μm (*Spherisorb ODS-2*; 250 X 4.6 mm) e a amostra eluída com *solvente A* (acetonitrilo: H_2O_2 , 9:1 v/v com 0,1 % de trietilamina) e *solvente B* (acetato de etilo). As amostras foram separadas usando um gradiente não linear de solvente B com um fluxo de 1 mL min^{-1} durante 21 min (25 – 41 % em 10,5 min; 41 – 100 % em 9,5 min - para separação de α e β -caroteno; 100 – 25 % em 1 min). O reequilíbrio da coluna foi feito durante 10 min com 25 % de acetato de etilo em acetonitrilo/água (9:1 v/v, contendo 0,1 % de trietilamina), a um fluxo de 1 mL min^{-1} . Os carotenoides foram detetados por um detetor de díodos e identificados pelos seus espectros de absorção e tempos de retenção, comparando com padrões. (neoxantina - Neo; violoxantina – Vio; anteroxantina – Ant; luteína - Lut; zeaxantina – Zea; α -caroteno; β -caroteno). Através das áreas dos picos das amostras e padrões foi possível quantificar os diferentes tipos de carotenoides, sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

2.3.3. Determinação de ascorbato

A concentração de ascorbato foi determinada pelo método espectrofotométrico (EAM) adaptado de Singh *et al.* (2006). Este método permite quantificar o ascorbato na sua forma total e reduzida, sendo a forma oxidada obtida por diferença. A quantificação resulta da redução do ferro (Fe^{3+}) em meio ácido com a consequente formação de um quelato vermelho entre o ião Fe^{2+} e o α,α' -dipiridilo presente no meio reacional.

Os extratos foram obtidos entre 0 e 4 °C, tendo-se macerado 0,5 g de folha fresca com 5 mL de tampão Tris-HCl (100 mM) com 1,5 mM de ditioneitol e 1 mM de EDTA, a pH 7,5 (em triplicado de cada amostra). O extrato foi centrifugado a 22.000 x g durante 20 min a 4 °C (*Sigma 03-18 K*).

Para a determinação do ascorbato total (AsC), a 200 µL de sobrenadante adicionaram-se 500 µL de solução de KH₂PO₄ (150 mM) com EDTA (5 mM), e 100 µL de ditioneitol (DTT a 10 mM), agitou-se e deixou-se em repouso 10 min à temperatura ambiente. A essa solução adicionou-se 100 µL de etilmaleimida (0,5 % p/v), 400 µL de ácido tricloroacético (TCA a 10 % p/v), 400 µL de ácido orto-fosfórico (44 % v/v), 400 µL de 2,2'-bipiridilo (0,26 M) em etanol (70 % v/v) e 200 µL de cloreto de ferro (FeCl₃ a 11 mM), agitou-se e incubou-se a 40 °C durante 1 h. As leituras de absorvância em EAM (*AnalyticJena SPECORD 200*) foram efetuadas a 525 nm.

Para a determinação do ascorbato reduzido (AsA), a 200 µL de sobrenadante adicionaram-se 500 µL de solução de KH₂PO₄ (150 mM) com EDTA (5 mM), e 100 µL de água desionizada, agitou-se e deixou-se em repouso 10 min à temperatura ambiente. A essa solução adicionou-se 100 µL de água desionizada, 400 µL de ácido tricloroacético (TCA a 10 % p/v), 400 µL de ácido orto-fosfórico (44 % v/v), 400 µL de 2,2'-bipiridilo (0,26 M) em etanol (70 % v/v) e 200 µL de cloreto de ferro (FeCl₃ a 11 mM), agitou-se e incubou-se a 40 °C durante 1 h. As leituras de absorvância em EAM (*AnalyticJena SPECORD 200*) foram, também, efetuadas a 525 nm.

Para calcular a concentração de ascorbato em função da absorvância realizou-se uma curva padrão com 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2 e 1,4 µmol de ácido ascorbico mL⁻¹. Os resultados foram expressos em µmol g⁻¹ MF.

A concentração de desidroascorbato (DHA), a forma oxidada, pode ser determinada por diferença entre a concentração de AsC e AsA, pela expressão: $ASC = AsA + DHA \leftrightarrow DHA = ASC - AsA$.

2.3.4. Determinação da prolina total

A concentração de prolina livre foi determinada pelo método espectrofotométrico (EAM) adaptado de Demiral & Turkan (2006). A quantificação da prolina é conseguida pela formação de um composto prolina-ninidrina capaz de ser detetado por EAM a um comprimento de onda de 525 nm. A extração deste composto é efetuada pelo tolueno e a minimização de

interferentes ocorre devido à formação de complexos proteína-ácido sulfosalicílico (Bates *et al.*, 1973).

Para obter os extratos, maceraram-se 0,6 g de folha fresca com 2 mL de ácido sulfosalicílico (3 % p/v) a 4 °C e centrifugou-se a 12.000 x *g* durante 15 min também a 4 °C (*Sigma 03-18 K*).

Em tubos de ensaio adicionaram-se 1 mL de sobrenadante, 1 mL de ninidrina ácida (2%) e 1 mL de ácido acético glacial. Agitaram-se e mantiveram-se os tubos tapados em banho-maria a 100 °C durante 1 h. Para terminar a reação arrefeceu-se rapidamente os tubos em banho de gelo. À solução obtida adicionou-se tolueno e agitou-se em *vortex* durante 2 min. Seguidamente recolheu-se a fase menos densa (de tolueno) e determinou-se a absorvância a 525 nm por EAM (*AnalyticJena Specord 200*).

Para calcular a concentração de prolina em função da absorvância realizou-se uma curva padrão com 0,00; 0,20; 0,40; 0,75; 1,25 e 2,00 µmol de prolina mL⁻¹. Utilizou-se 1 mL de cada solução padrão e seguiu-se o mesmo procedimento utilizado para determinar prolina na amostra. Resultados foram expressos em µmol g⁻¹ MF.

2.3.5. Determinação de fitoquelatinas e glutathiona reduzida (GSH)

As fitoquelatinas (PC) e a glutathiona reduzida (GSH) foram determinadas por HPLC segundo a metodologia de Fernández *et al.* (2013).

Todos os passos de extração decorreram numa câmara a 4 °C, realizando triplicados de cada amostra. A 0,05 g de amostra fresca (reduzida a pó por maceração em azoto líquido) foi adicionado 1 % de polivinilpolipirrolidona insolúvel (PVPP) e 750 µL de HCl a 0,1. A mistura foi agitada por 30 s, submetida a ultrassons durante 5 min, agitada novamente por 30 s e finalmente centrifugada a 15.000 x *g* por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi colhido por uma seringa e filtrado através de filtros *Millex-HV* de 0,45 µm.

Do filtrado foram colhidos 150 µL e imediatamente injetados no HPLC (*Waters 600*). A separação ocorreu numa coluna C18 de 5 µm (*Kromasil 100, Scharlau*) e a amostra eluída com *solvente A* (acetonitrilo:H₂O, 2:98 v/v com 0,05 % ácido trifluoroacético - TFA) e *solvente B* (acetonitrilo:H₂O, 98:2 v/v com 0,05 % TFA). A separação ocorreu usando um gradiente linear de *solvente B* com um fluxo de 1,5 mL min⁻¹ durante 30 min (0 – 25 % em 25 min e 25 – 50 % em 5 min).

A derivatização pós-coluna realizou-se com o reagente de Ellman com um fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ (Ellman, 1959) e os tióis foram detetados a 412 nm, por um detetor de fotodiodos (Waters 996). Os picos resultantes foram identificados, e quantificados por comparação com padrões externos de GSH, distinguindo-se as várias PC (PC2, PC3 e PC4) de acordo com o método descrito por Fernández *et al.* (2013). Os resultados foram expressos em $\text{nmol g}^{-1} \text{ MF}$.

2.3.6. Determinação da concentração de ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos (AO) foram determinados por HPLC, segundo a metodologia de Arneloti *et al.* (2008).

Numa câmara entre os 0 e 4 °C, 0,1 g de amostra fresca (reduzida a pó por maceração em azoto líquido) com 1 mL de água Milli-Q foram agitadas durante 30 s e depois centrifugadas a $14.000 \times g$, durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado através de filtros *Millex-LG* de $0,20 \mu\text{m}$ e imediatamente injetados 6 μL no HPLC Waters 296, acoplado a um detetor de fotodiodos Waters 296.

A separação realizou-se numa coluna de fase reversa *Alltima C18* de $5 \mu\text{m}$, e a amostra foi eluída com uma solução de KH_2PO_4 (125 mM) a pH 2,5, ajustado com ácido fosfórico concentrado (H_3PO_4) com um fluxo de 2 mL min^{-1} (Arneloti *et al.*, 2008).

Os picos resultantes foram comparados com padrões de ácido oxálico, tartárico, málico, malónico, cítrico, succínico e glutárico (*Sigma-Aldrich*) de modo a obter resultados qualitativos e quantitativos de acordo com os métodos descritos por Fernández *et al.* (2014) e expressos em $\text{mmol g}^{-1} \text{ MF}$.

As soluções *stock* dos padrões foram preparadas para as seguintes concentrações: 10 mM de ácido oxálico, 25 mM de ácido tartárico, 50 mM de ácido málico, 50 mM de ácido malónico, 50 mM de ácido cítrico, 100 mM de ácido succínico e 100 mM de ácido glutárico. As diferentes concentrações para obtenção das curvas de calibração foram obtidas através da diluição em água Milli-Q dos padrões preparados.

2.3.7. Determinações de atividade enzimática

Foi determinada a atividade das enzimas catalase (CAT), guaiacol-peroxidase (GPOD), superóxido-dismutase (SOD), ascorbato-peroxidase (APX), glutatona-peroxidase (GPX) e

glutathiona-redutase (GR), segundo métodos descritos por Martins *et al.* (2011) e Moreira *et al.* (2015).

A atividade enzimática é obtida pela medição da quantidade de substrato consumido ou produto formado resultante da sua atividade ao longo do tempo (absorvância vs tempo). A velocidade inicial da reação catalisada pela enzima, dada pelo declive da reta obtida na representação da absorvância vs tempo, é diretamente proporcional à quantidade de enzima existente, pelo que a quantidade de enzima numa amostra é estimada pela sua atividade enzimática. Assim, a atividade enzimática pode ser obtida por EAM, que nos dá a quantidade de produto formado por unidade e tempo em condições bem definidas. Para todos os métodos enzimáticos utilizados, a atividade enzimática foi obtida em triplicado, para cada amostra e expressa em unidade de enzima (U), definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a decomposição de 1 μmol de substrato min^{-1} , à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em unidade de enzima por grama de amostra em matéria fresca (U g^{-1} MF).

2.3.7.1. Atividade enzimática da CAT

A CAT é uma enzima capaz de decompor H_2O_2 em água. A determinação da velocidade inicial é obtida a partir da taxa de diminuição da absorvância devido à decomposição de H_2O_2 em água e oxigénio, sendo a quantidade de enzima presente proporcional à diminuição de absorvância observada (Aebi, 1983).

A preparação de amostras realizou-se entre os 0 e 4 °C. Os extratos foram obtidos por maceração de 0,5 g de folhas frescas em 2 mL de solução tampão Tris-HCl (100 mM) a pH 7,5, contendo ditioneitol (1,5 mM), EDTA (1 mM), Triton X-100 (0,1 %) e PVPP insolúvel (2% w/w). Os extratos foram centrifugados a 12.000 x g, durante 20 min a 4 °C (*Sigma 3-18 K*).

A atividade enzimática foi determinada num meio reacional com 11 mM de H_2O_2 em tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,6). A absorvância foi determinada em contínuo, a 240 nm durante 2 min contra um ensaio em branco, em que o H_2O_2 é substituído por tampão.

A atividade enzimática da CAT em U mL^{-1} é dada pela seguinte expressão (adaptada de Aebi, 1983), usando o valor de $39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como coeficiente de absorvidade molar do H_2O_2 :

$$\text{Atividade CAT} = \frac{\Delta\text{Abs}}{\Delta t} \times \frac{V_t}{39,4 \times V} \quad (\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = \text{U mL}^{-1})$$

em que:

$\Delta\text{Abs}/\Delta t$ é o declive da reta obtida no espectrofotómetro, durante um intervalo de tempo de 2 min;

V é o volume de extrato (mL);

V_t é o volume total na cuvette (mL).

2.3.7.2. Atividade enzimática da GPOD

A reação catalisada pela GPOD promove a degradação de H_2O_2 tendo como agente redutor o guaiacol ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$), formando um composto corado, o tetraguaiacol e água (Gajewska *et al.*, 2006; Mourato *et al.*, 2009). A determinação da atividade enzimática obteve-se pela medição do aumento da absorvância ao longo do tempo, devido à formação de tetraguaiacol.

A preparação de amostras realizou-se entre os 0 e 4 °C, utilizando a mesma solução tampão de extração que em 2.3.7.1. Os extratos foram igualmente centrifugados a 12.000 x g, durante 20 min a 4 °C (*Sigma 3-18 K*).

A determinação foi efetuada num meio reacional contendo 31 mM de guaiacol e 4 mM de H_2O_2 em solução tampão de acetato de sódio (200 mM, pH 6,0). A quantidade de tetraguaiacol formada foi determinada pela leitura em contínuo da absorvância a 470 nm durante 2 min.

A atividade enzimática da GPOD em U mL^{-1} é dada pela seguinte expressão (adaptada de Gajewska *et al.*, 2006), usando o valor de $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como coeficiente de absortividade molar do tetraguaiacol:

$$\text{Atividade GPOD} = \frac{\Delta\text{Abs}}{\Delta t} \times \frac{V_t}{26,6 \times V} \quad (\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = \text{U mL}^{-1})$$

em que:

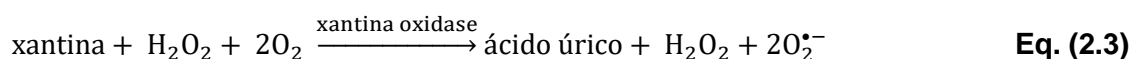
$\Delta\text{Abs}/\Delta t$ é o declive da reta obtida no espectrofotómetro, durante um intervalo de tempo de 2 min;

V é o volume de extrato (mL);

V_t é o volume total na cuvette (mL).

2.3.7.3. Atividade enzimática da SOD

A SOD é uma enzima capaz de oxidar o ião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), obtendo-se água e oxigênio (equação 2.1) (Rubio *et al.*, 2002). O método descrito baseia-se na competição do $O_2^{\bullet-}$ pela SOD e pelo citocromo-C-férrico (CitC-Fe³⁺). Na presença de $O_2^{\bullet-}$ o CitC-Fe³⁺ é reduzido, dando origem CitC-Fe²⁺ alterando a coloração da solução (equação 2.2). A SOD presente nas amostras, compete com o CitC-Fe³⁺ pela redução dos radicais. Na presença de SOD existe menor quantidade de CitC-Fe²⁺, diminuindo a formação de produto corado. Os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) foram produzidos numa reação catalisada pelo sistema xantina/xantina-oxidase (EC 1.17.3.2) (equação 2.3). As reações descritas encontram representadas abaixo.



A determinação da velocidade inicial obteve-se a partir da taxa de diminuição da absorvância devido à menor produção de CitC-Fe²⁺, ao longo do tempo. A unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir, em 50 %, a redução do citocromo-C-férrico (Moreira *et al.*, 2015).

A preparação de amostras realizou-se entre os 0 e 4 °C, utilizando o mesmo procedimento de extração que o descrito em 2.3.7.1.

O meio reacional, em solução tampão fosfato de potássio (100 mM, a pH 7,6), foi constituído por uma solução contendo EDTA a 0,05 mM, xantina a 0,25 mM e CitC-Fe³⁺ a 0,025 mM, e solução de xantina-oxidase (0,025 U). A leitura da absorvância realizou-se a 550 nm durante 1 min.

Neste método é necessária a realização de um ensaio de referência (ER), onde se substitui o extrato por tampão de extração, permitindo que ocorra a reação 3 sem competição com a SOD. Deste modo, o valor da absorvância do ER é sempre superior ao obtido numa amostra.

A atividade enzimática da SOD em U mL⁻¹ é dada pela seguinte expressão (adaptada de Rubio *et al.*, 2002):

$$\text{Atividade SOD} = \frac{0,5 \times \Delta \text{Abs}_{\text{ER}}}{\Delta \text{Abs}_{\text{amostra}}} \times \frac{V_t}{V} \quad (\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = \text{U mL}^{-1})$$

em que:

$\Delta\text{Abs}_{\text{ER}}$ é a variação da absorvância para o ensaio de referencia, ou seja, o declive da reta obtida no espectrofotômetro, durante um intervalo de tempo de 2 min;

$\Delta\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a variação da absorvância para a amostra, ou seja, o declive da reta obtida no espectrofotômetro, durante um intervalo de tempo de 2 min;

V é o volume de extrato (mL);

V_t é o volume total na cuvette (mL).

2.3.7.4. Atividade enzimática da APX

A APX, tal como a CAT e GPOD é uma enzima que decompõe H_2O_2 em água, mas utilizando AsA como agente redutor ($\text{AsA} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{APX}} \text{MDHA} + 2\text{H}_2\text{O}$) (Ahmad *et al.*, 2008). A atividade enzimática é obtida pela diminuição de absorvância ao longo do tempo resultante da oxidação de AsA formando MDHA, correspondendo esta taxa, à velocidade inicial (Sharma & Dubey, 2004).

A preparação da amostra realizou-se entre os 0 e 4 °C. Os extratos foram obtidos por maceração de 0,5 g de folhas frescas em 2 mL de solução tampão Tris-HCl (100 mM) a pH 7,5, contendo ditiotreitol (1,5 mM), EDTA (1 mM), ascorbato (10 mM) e PVPP insolúvel (2 % w/w). Os extratos foram centrifugados a 12.000 x g, durante 20 min a 4 °C (*Sigma 3-18 K*).

O meio reacional, para determinação da atividade enzimática da APX, foi constituído por 0,25 mM de ascorbato com 0,025 mM de EDTA e 0,25 mM de H_2O_2 em tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,6). A absorvância foi determinada em contínuo a 290 nm, durante 2 min contra um ensaio em branco, onde a amostra foi substituída por tampão de extração e o H_2O_2 por tampão fosfato.

A atividade enzimática da APX em U mL^{-1} é dada pela seguinte expressão (adaptada de Sharma & Dubey, 2004), usando no valor de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como coeficiente de absorvidade molar do AsC:

$$\text{Atividade APX} = \frac{\Delta\text{Abs}}{\Delta t} \times \frac{V_t}{2,8 \times V} \quad (\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = \text{U mL}^{-1})$$

em que:

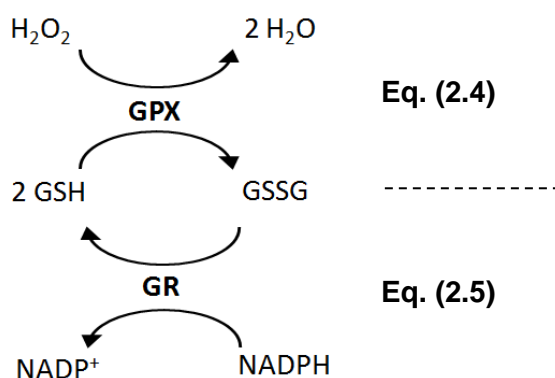
$\Delta\text{Abs}/\Delta t$ é o declive da reta obtida no espectrofotómetro, durante um intervalo de tempo de 2 min;

V é o volume de extrato (mL);

V_t é o volume total na cuvette (mL).

2.3.7.5. Atividade enzimática da GPX

A GPX catalisa a reação de redução de H_2O_2 em água utilizando GSH como agente redutor (equação 2.4) (Ahmad *et al.*, 2008). A glutathiona reduzida (GSSH) é regenerada pela GR (2.3.8.6.) através da oxidação de fosfato dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) em NADP^+ (equação 2.5); as reações envolvidas nesta determinação decorrem tal como representado no esquema reacional seguinte:



A determinação da velocidade inicial obteve-se a partir da taxa de diminuição da absorvância devido ao consumo de NADPH (Aravind & Prasad, 2005).

A preparação da amostra realizou-se entre os 0 e 4 °C. Os extratos foram obtidos por maceração de 0,5 g de folhas frescas em 2 mL de solução tampão Tris-HCl (100 mM) a pH 7,5, contendo ditiotreitol (1,5 mM), EDTA (1 mM), Triton X-100 (0,1 % p/v), cisteína (5 mM), fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMS, 0,1 mM) e PVPP insolúvel (2 % w/w). Os extratos foram centrifugados a 12.000 x g, durante 20 min a 4 °C (*Sigma 3-18 K, Osterode am Harz*).

A atividade enzimática foi dada pela leitura da absorvância a 340 nm, durante 2 min, usando um meio reacional, constituído por 114 mM NaCl, 1,5 mM de GSH, 0,3 mM de NADPH, 0,01 U de GR e 0,25 mM de H₂O₂ em solução tampão tris HCl (50 mM, pH 7,9).

A atividade enzimática da GPX em U mL⁻¹ é dada pela seguinte expressão (adaptada de Aravind & Prasad, 2005), usando o valor de 6,2 mM⁻¹ cm⁻¹ como coeficiente de absortividade molar do NADPH:

$$\text{Atividade GPX} = \frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta t} \times \frac{V_t}{6,2 \times V} \quad (\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = \text{U mL}^{-1})$$

em que:

$\Delta \text{Abs}/\Delta t$ é o declive da reta obtida no espectrofotómetro, durante um intervalo de tempo de 2 min ;

V é o volume de extrato (mL);

V_t é o volume total na cuvette (mL).

2.3.7.6. Atividade enzimática de GR

Como descrito no ponto 2.3.7.5., a GR é uma enzima responsável pela regeneração da GSH, através da oxidação do NADPH ($\text{GSSH} + \text{NADPH} \xrightarrow{\text{GR}} 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$) (Aravind & Prasad, 2005; Ahmad *et al.*, 2008). O método utilizado permite determinar a atividade da GR através do aumento da absorvância obtido pela redução de 5,5-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) pela GSH, com a formação de 5-tio-2-ácido nitrobenzóico (TNB) (Shanker *et al.*, 2004).

A preparação da amostra realizou-se entre os 0 e 4 °C. Os extratos foram obtidos por maceração de 0,5 g de folhas frescas em 2 mL de solução tampão Tris-HCl (100 mM) a pH 7,5, contendo ditioneitol (1,5 mM), EDTA (1 mM), Triton X-100 (0,1 %) e PVPP insolúvel (2 % w/w). Os extratos foram centrifugados a 12000 x g, durante 20 min a 4 °C (*Sigma 3-18 K*).

O meio reacional foi constituído por 0,75 mM de DTNB, 0,1 mM de NADPH e 1 mM de GSSG em solução tampão fosfato de potássio com 1 mM de EDTA (100 mM, pH 7,6) e a atividade enzimática foi determinada pela leitura contínua da absorvância a 412 nm durante 2 min.

A atividade enzimática da GR em U mL⁻¹ é dada pela seguinte expressão (adaptada de Shanker *et al.*, 2004), usando 14,15 mM⁻¹ cm⁻¹ como coeficiente de absorvidade molar do TNB:

$$\text{Atividade GR} = \frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta t} \times \frac{V_t}{14,15 \times V} \quad (\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = \text{U mL}^{-1})$$

em que:

$\Delta \text{Abs}/\Delta t$ é o declive da reta obtida no espectrofotómetro, durante um intervalo de tempo de 2 min;

V é o volume de extrato (mL);

V_t é o volume total na cuvette (mL).

2.3.8. Determinação da concentração de Peróxido de Hidrogénio

Determinou-se a concentração de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) seguindo o método espectrofotométrico baseado em Singh *et al.* (2006). Este método permite a determinação do H₂O₂ através da quantificação de iodeto de potássio (KI) oxidado pelo peróxido de hidrogénio, em meio ácido ($2\text{I}^- + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{I}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$).

Quando o H₂O₂ fica em contacto com KI, os iões iodeto oxidam-se lentamente e há uma variação de absorvância que pode ser medida a 390 nm.

O extrato foi obtido por maceração de 0,5 g de amostra fresca com 2,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1 % (p/v). O procedimento de preparação da amostra foi realizado no mínimo em triplicado. Os extratos obtidos foram centrifugados a 10.000 x g durante 15 min.

Ao extrato centrifugado foram retirados 100 µL de sobrenadante, aos quais foram adicionados 900 µL de tampão fosfato (0,1 M e pH 7,6) e 1 mL de solução de iodeto de potássio (KI) a 1 M. A absorvância da mistura foi lida a um comprimento de onda de 390 nm.

A concentração de H₂O₂ foi obtida a partir da elaboração de uma curva padrão com seis padrões com as concentrações 0, 1, 2, 3, 4 e 5 µg L⁻¹ (Singh *et al.*, 2006). Os resultados foram expressos tendo em conta a massa da amostra, em µg g⁻¹ MF.

2.3.9. Determinação da Peroxidação Lipídica

A peroxidação dos lípidos foi determinada pela medição do malondialdeído (MDA) produzido, usando o método com ácido tiobarbiturico (TBA) descrito por Rao & Sresty (2000) e mais recentemente por Demiral & Turkan (2005). O MDA é um produto da peroxidação lipídica e quando se adiciona TBA ao meio forma-se um complexo MDA-2TBA passível de ser determinado a 532 nm. A leitura a 600 nm da mesma amostra permite a correção para determinados interferentes (Demiral & Turkan, 2005).

Para a extração de MDA, maceraram-se 0,5 g de amostra fresca, tanto de raiz como de folha, com 2,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1 % (p/v). O procedimento de preparação da amostra foi realizado no mínimo em triplicado. Os extratos obtidos foram centrifugados a 10.000 x g durante 15 min. Adicionou-se 1 mL de sobrenadante a 4 mL de solução de TCA a 20 % (p/v) e TBA a 0,5 % (p/v). Esta mistura foi aquecida em banho-maria durante 30 min a aproximadamente 95 °C, seguido de um arrefecimento rápido em banho de gelo. Após o arrefecimento, a mistura foi submetida a um processo de centrifugação a 10.000 x g durante 15 min e foi lida a absorvância do sobrenadante (em duplicado) a um comprimento de onda de 532 nm. As medições foram corrigidas para a turbidez não específica por subtração dos valores de absorvância a um comprimento de onda de 600 nm.

A concentração de MDA (expressa em mM) foi calculada usando o coeficiente de absortividade molar deste composto, 155,10 mM⁻¹ cm⁻¹, segundo a equação:

$$MDA = \frac{(Abs_{532}) - (Abs_{600})}{155,10}$$

Os resultados foram expressos em função do peso da amostra (mM g⁻¹).

2.4. Determinações analíticas em solos

2.4.1. Determinação do pH e condutividade elétrica

O pH do solo foi determinado numa suspensão de solo/água (pH H₂O) e numa suspensão solo/solução KCl a 1 M (pH KCl ou acidez de troca), numa proporção de 1:2,5, após 1 h de contacto, utilizando um medidor de pH *Metrohm model 632*.

A condutividade elétrica foi determinada na mesma suspensão de pH H₂O, utilizando um condutivímetro *Metrohm model 660*.

2.4.2. Determinação de Elementos Químicos

Apenas parte dos elementos químicos totais no solo se encontram na sua forma disponível para as plantas. Por esse motivo para além da determinação dos elementos totais, extraídos por digestão ácida, realizou-se a extração de bases de troca (ou macronutrientes) e micronutrientes extraíveis, correspondendo assim a uma aproximação dos elementos extraíveis pela planta. A determinação de elementos totais ou extraíveis das soluções de amostra foi sempre realizada por EAA (referida no ponto 2.3.1).

2.4.2.1. Determinação de elementos totais

Para determinar os elementos totais realizou-se a digestão do solo num digestor *DigiPREP MS*. Mediram-se cerca de 0,5 g de solo para um tubo de digestão, ao qual foram adicionados 2 mL de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em porções de 0,5 mL, de modo a oxidar a matéria orgânica existente. Quando a reação abrandou e a produção de espuma se reduziu adicionaram-se 9 mL de HCl concentrado, também em dosagens de 0,5 a 1 mL, e 3 mL de HNO_3 concentrado. Após a preparação das amostras os tubos foram submetidos à digestão num ciclo de 170 min (20 min rampa → 10 min a 45 °C → 10 min de rampa → 10 min a 75 °C → 10 min rampa → 120 min a 95 °C).

Após terminar o processo de digestão ácida e de arrefecidos os tubos à temperatura ambiente, transferiu-se o conteúdo para balões volumétricos de 25 mL, sendo então o volume perfeito com água Milli-Q. Os extratos obtidos foram posteriormente utilizados para a determinação destes elementos por EAA em chama ou câmara de grafite, consoante a quantidade presente.

2.4.2.2. Concentração de micronutrientes extraíveis

A determinação de micronutrientes extraíveis realizou recorrendo ao método de Lakanen & Ervio (1971).

A solução de amostra de solo obteve-se por agitação de 4 g de solo com 40 mL de solução de extração (ácido acético 0,5 M, acetato de amónio 0,5 M e EDTA 0,02 M) durante 15 min. Após centrifugação durante 10 min a 3.500 x g, quantificou-se o Cu, Fe, Zn e Mn por espectrofotometria de chama de absorção atómica (*Unicam Solaar M*).

2.4.2.3. Concentração de macronutrientes extraíveis

A determinação de macronutrientes extraíveis ou base de troca realizou recorrendo ao método de Schollenberger & Simon (1945).

A solução de amostra de solo obteve-se por agitação de 2 g de solo com 30 mL de solução de acetato de amónio (1 M, pH 7) durante 15 min. Após centrifugação durante 10 min a 3.500 x g, quantificou-se o Ca, Mg, K e Na por espectrofotometria de chama de absorção atômica (*Unicam Solaar M*).

2.4.3. Determinação do carbono orgânico total

O carbono orgânico total foi determinado diretamente num analisador de carbono (*Skalar TOC Formac – Analyzer*).

Em cadinhos de quartzo colocaram-se 1,5 g de amostra de solo e estes foram inseridos num amostrador automático. Num único movimento vertical (baixo para cima) a amostra foi colocada no forno de combustão a alta temperatura.

A 1100 °C o carbono foi totalmente oxidado a CO₂ na presença de oxigénio. Após a reação de oxidação no forno catalisador, a amostra atravessou um condensador Peltier de modo a remover a humidade formada por condensação. O CO₂ do gás da amostra, foi medido por um detetor de infra vermelhos não dispersivo para o carbono total, sendo valor expressão em percentagem (%).

2.4.4. Determinação da concentração NPK extraíveis

O fósforo (P) e K extraíveis foram determinados pelo método Egner-Riehm (Balbino, 1968). A solução extrativa, lactato de amónio e ácido acético a pH 3,75, utilizada permitiu simultaneamente extrair P e K. No caso do K (principal forma disponível é o potássio de troca), a extração efetuou-se pela permuta de K⁺ do complexo de troca por NH₄⁺ da solução de extração. Por outro lado, a extração de P ocorreu por controlo da reação do meio (solução tampão pH ácido) e da atividade do ião cálcio (pelos iões acetato e lactato), os principais fatores que condicionam a atividade de P no solo. O pH baixo permitiu a solubilização de parte dos fosfatos de cálcio e os iões acetato e lactato podem permutar com o fosforo adsorvido, permitindo a libertação de fosforo.

Após extração o K foi determinado num fotómetro de chama (FC), onde a solução é aspirada para uma chama onde ocorre a excitação de átomos. Quando os eletrões passam do estado excitado para o estado fundamental existe emissão de energia sob a forma de radiação. A energia emitida atravessa um filtro ótico que permite selecionar o comprimento de onda característico deste elemento, sendo por fim determinada a intensidade da emissão. Por outro lado, o P foi quantificado por EAM (princípio descrito no ponto 2.3.2.2), fazendo o fosforo livre reagir com molibdato de amónio na presença de *foto-rex molíbdico* e cloreto estanoso, formando uma molécula complexa de coloração azul, absorvendo radiação a 775 nm.

Para extração de P e K agitaram-se durante 2 h, 2 g de solo em 40 mL da solução de extração descrita. A solução obtida foi filtrada e o K quantificado diretamente por FC. Do restante filtrado recolheram-se 10 mL e adicionaram-se 2 mL de reagente *foto-rex molíbdico* e 1 mL de solução de cloreto estanoso em HCl (6 M). As soluções mantiveram-se em repouso durante 30 min, permitindo o desenvolvimento de cor e a absorvância foi lida em EAM a 775 nm. A concentração de P foi expressa em mg de P_2O_5 kg^{-1} e de K em mg de K_2O kg^{-1} .

O azoto (N), sob a forma de iões nitrato (NO_3^-) e amónio (NH_4^+), foi determinado na solução de amostra através de um auto analisador de fluxo segmentado (*Skalar ScanPlus*), como descrito por Houba *et al.* (1995). Este processo automatizado baseia-se na passagem da solução de amostra por uma coluna constituída por Cu e Cd granulado de modo a reduzir os iões nitrato a nitrito (NO_2^-). Os nitritos são quantificados pela diazotação com sulfanilamida e acoplamento com dicloridrato de α -naftiletilinodiamina de modo a formar um composto corado (reação de Greiss). A determinação é depois feita por espectrofotometria de absorção, realizada a um comprimento de onda de 540 nm. Por outro lado a determinação de amónio ocorre através da reação modificada de *Berthelot*, na qual o ião amónio é clorado para monocloramina que reage com salicilato de modo a obter 5-aminosalicilato. Após a oxidação e o acoplamento oxidativo, forma-se um complexo de cor verde, determinado por espectrofotometria de absorção, realizada a um comprimento de onda de 660 nm. Os iões tartarato são adicionados ao meio alcalino altamente reativo de modo a evitar a precipitação de Ca e Mg (Antweiler *et al.*, 1996).

A solução de amostra foi obtida por agitação durante 1 h de 6 g de solo em 30 mL de KCl a 2 M, seguida de centrifugação a $3.500 \times g$ durante 10 min. O sobrenadante foi transferido para tubos de leitura e inserido no amostrador automático do equipamento. Os resultados foram expressos em mg L^{-1} .



2.4.5. Caracterização do chorume de bovino

O chorume de bovino (CB) teve origem numa quinta de gado leiteiro perto da zona de Lisboa, sendo os animais alimentados com ração e silagem. O CB foi conservado em bidões de plástico a 4 °C antes da aplicação. As características do CB (matéria seca, matéria orgânica, pH, condutividade elétrica, N extraível, P extraível e concentração de K, Na, Mg, Ca, Fe, Cu, Zn e Mn) foram determinados segundos os métodos descritos por Figueiro *et al.* (2012).

A matéria seca (MS) foi determinada por secagem de 100 g de material fresco numa estufa a 105 °C até atingir peso constante. O N total foi determinado utilizando um método de *Kjeldahl* modificado, com base numa digestão com ácido sulfúrico e um catalisador de cobre-selênio, usando uma unidade térmica de Kjeldahl e uma unidade de destilação compacta. O N mineral foi extraído com KCl a 2 M, numa proporção de 1:10 (p/v). As concentrações de N na forma de ião amónio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) foram determinados pelo método colorimétrico descrito em 2.4.4 para o solo. O valor de pH e de condutividade elétrica de CB foi determinado após 1 hora de contacto, com agitação ocasional numa proporção CB:água de suspensão de 1:5 (p/v). O C solúvel foi determinado num analisador elementar (*Skalar TOC Formac - Analyzer*) por combustão a 850 °C seguido de deteção por infravermelhos, após extração com solução de CaCl_2 a 0,01 M, proporção 1:10 (p/v).

2.5. Tratamento estatístico

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente, por recurso ao programa estatístico “SPSS Statistics 13.0” (SPSS Inc.).

Aos resultados foi aplicada a análise de variância a um fator (ANOVA), para avaliar o efeito dos diferentes tratamentos com cádmio ao longo do tempo nos em ensaio em solução nutritiva (Cap. III, IV e V) e efeitos entre os diferentes tratamentos para o mesmo nível de CB (%) no ensaio do cap. VI. Para comparação das médias utilizou-se o teste *Tukey*, para um nível de confiança de 95 %. Para avaliar diferenças entre médias de amostras controlo e contaminadas com Cd realizou-se o teste *t* de *Student*.

Nos gráficos as letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias de cada dia para cada modalidade de contaminação ou, no cap.V, entre os tratamentos de Cd para cada concentração de CB e os asteriscos indicam sempre as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre amostras controlo e amostras contaminadas.

As barras de erro das colunas nos gráficos apresentados, ou o valor após o símbolo \pm nas tabelas, representam o desvio padrão (DP) da média das amostras.

Foram também estabelecidas correlações nos Capítulos IV e V, para cada uma das concentrações de Cd na solução nutritiva, em plantas jovens e adultas, relativamente à variação ao longo do tempo de exposição ao Cd, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson, obtido pelo programa Excel. No Cap.IV, além de se correlacionarem os parâmetros com o tempo (dias 0, 2, 6, 13, 17 e 21), também se correlacionou com a concentração de Cd na solução nutritiva (0, 5, 10, 25, 50 e 100 μM).

Capítulo III

Ensaio de curta duração de
acumulação de Cd



Capítulo III – Ensaio de curta duração de acumulação de Cd

3.1. Introdução

O Cd é um elemento químico não essencial capaz de provocar alterações no desenvolvimento de plantas, causando danos foliares, como necroses, regressão no crescimento e até mesmo a sua morte. Consoante a espécie da planta e a concentração disponível deste metal no meio, as plantas podem apresentar comportamentos diferentes.

As plantas que, quando expostas a um metal (neste caso Cd) apresentam sinais de toxicidade são consideradas indicadoras; quando, na presença de elevada concentração de metal, a absorção radicular é restrita (quer por ligação do metal a exsudados libertados, à parede celular ou a glúcidos extracelulares) são consideradas excluseras; e quando têm a capacidade de acumular elevadas concentrações na parte aérea são consideradas acumuladoras ou hiperacumuladoras (DalCorso *et al.*, 2008; Peralta-Videa *et al.*, 2009; Rascio & Navai-Izzo, 2011; Hassan & Aarts, 2011).

A capacidade de acumular este metal, altamente tóxico para seres vivos (Hasanuzzaman *et al.*, 2013) tem sido descrita por vários autores (Sandálio *et al.*, 2001; De la Rosa *et al.*, 2004; Nedjimi & Daoud, 2009; Dandan *et al.*, 2011; Martinez – Peñalver *et al.*, 2012; Mohamed *et al.*, 2012; Roychoudhury *et al.*, 2012; Marques & Nascimento *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014). Nestes estudos foram utilizadas várias espécies de plantas, em fases de desenvolvimento e condições de crescimento distintas, utilizando desde concentrações de Cd baixas, na ordem dos 0,01 μM (Dandan *et al.*, 2011), a concentrações muito elevadas, na ordem dos 1500 μM (Roychoudhury *et al.*, 2012). A maior incidência de concentrações utilizada é de 0 a 150 μM de Cd, e alguns dos autores mencionados referem, acima desse valor, a observação de danos consideráveis ou mesmo a senescência da planta (Sandálio *et al.*, 2001; Nedjimi & Daoud, 2009). Por outro lado, plantas mais sensíveis, como *Jatropha curcas* L. com 44 dias de crescimento e uma contaminação de 40 μM Cd durante 20 dias, apresentaram menor crescimento e desenvolvimento radicular bem como necroses, quando comparadas com o controlo (Marques & Nascimento *et al.*, 2013). Sandálio *et al.* (2001) referem que a exposição de Cd a concentrações superiores a 75 μM , provocam danos consideráveis em *Pisum sativum*, utilizando nos seus ensaios a concentração máxima de 50 μM de Cd. De la Rosa *et al.* (2004) descreve o estímulo de crescimento de *Salicornia kali* quando exposta a concentrações de Cd relativamente baixas (20 mg Cd L⁻¹ \approx 0,18 μM de Cd).

A absorção radicular é a via de entrada de Cd neste tipo de ensaios. As raízes são o primeiro órgão da planta em contacto com o contaminante e geralmente apresentam maior concentração deste ligado às paredes celulares, ou armazenado nos vacúolos sob a forma de quelatos, sendo este um dos métodos de defesa de plantas acumuladoras (Martins *et al.*, 2013).

Com este ensaio pretendeu-se avaliar a resposta da planta de espinafre a um tempo curto de contaminação com Cd (máximo de 24 h), relativamente à capacidade de acumulação deste elemento na parte aérea da planta. Com base nos trabalhos descritos por outros autores foram definidas concentrações intermédias, que permitissem que a planta mantivesse a capacidade de desenvolvimento mas que simultaneamente fosse suficiente para causar a indução de uma resposta metabólica por parte da planta.

3.2. Material e métodos

O ensaio foi desenvolvido, em solução nutritiva, na sala de crescimento e nas condições descritas em 2.1.1. Plantas de espinafre com 40 dias de crescimento, foram expostas a 25 e 50 μM de Cd. Após os tempos de 0, 0,5, 1, 2, 3, 6, 12 e 24 h as plantas foram colhidas para determinação da concentração de Cd em folhas, pecíolos e raízes.

3.3. Resultados e discussão

Nas figuras 3.1, 3.2 e 3.3 estão representadas as concentrações de Cd ao longo de 24 h de exposição, para raízes, pecíolos e folhas, respetivamente.

Para melhor perceção das curvas, uma vez que se verifica uma grande proximidade das concentrações de Cd entre os tempos iniciais face aos finais (até às 3 h de exposição), optou-se pela apresentação dos resultados até às 3 h num segundo gráfico (figuras 3.1b, 3.2b e 3.3b), uma ampliação do gráfico com a totalidade dos tempos (figuras 3.1a, 3.2a e 3.3a).

A acumulação de metais pesados como o Cd, nas plantas, é geralmente mais elevada nas raízes. Neste órgão estes elementos podem ficar retidos, por adsorção ou fixação a componentes estruturais, ou podem ser translocados para a parte aérea.

Como se pode observar na figura 3.1, nas raízes, ao fim de 24 h de exposição a 25 μM de Cd, detetaram-se $510,86 \pm 38,09 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ MS}$, e $623,33 \pm 72,03 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ MS}$ na



exposição a 50 μM de Cd. Em 24 h, apenas 9,96 % do Cd das raízes foi transferido para a parte aérea em plantas expostas a 25 μM de Cd, e 14,81 % em plantas expostas a 50 μM de Cd, sem demonstrar danos visíveis (figura 3.4).

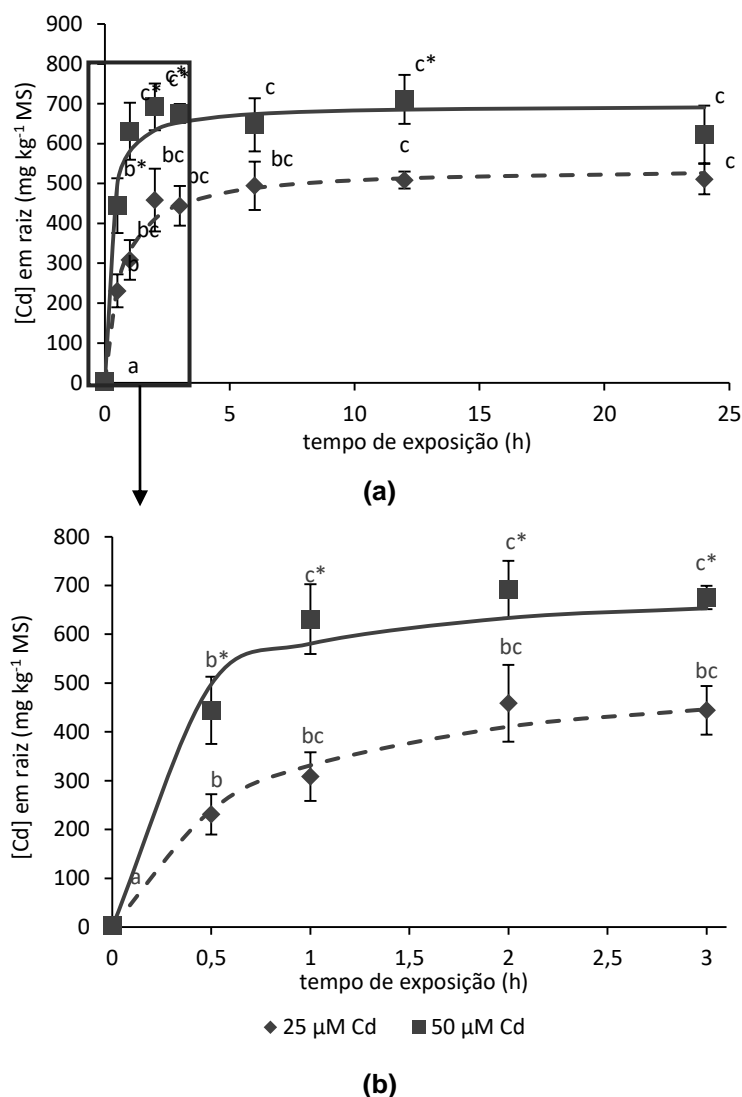


Figura 3.1 - Concentração de Cd (mg kg^{-1} MS) em raiz de espinafre com 40 dias de crescimento, ao longo de 24 h de exposição (a) e nas 3 primeiras horas de exposição (b).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão, diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos para cada contaminação e o asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as duas concentrações estudadas (25 e 50 μM Cd), para cada tempo ($n = 6$).

Ajuste para 25 μM : $C = (C_{\text{max}} \cdot t_{\text{Cd}}) / (K_{\text{Cd}} + t_{\text{Cd}}) = (540,00 t_{\text{Cd}}) / (0,63 + t_{\text{Cd}})$, $R^2 = 0,9858$. Linha descontinua

Ajuste para 50 μM : $C = (C_{\text{max}} \cdot t_{\text{Cd}}) / (K_{\text{Cd}} + t_{\text{Cd}}) = (696,76 t_{\text{Cd}}) / (0,20 + t_{\text{Cd}})$, $R^2 = 0,9610$. Linha continua

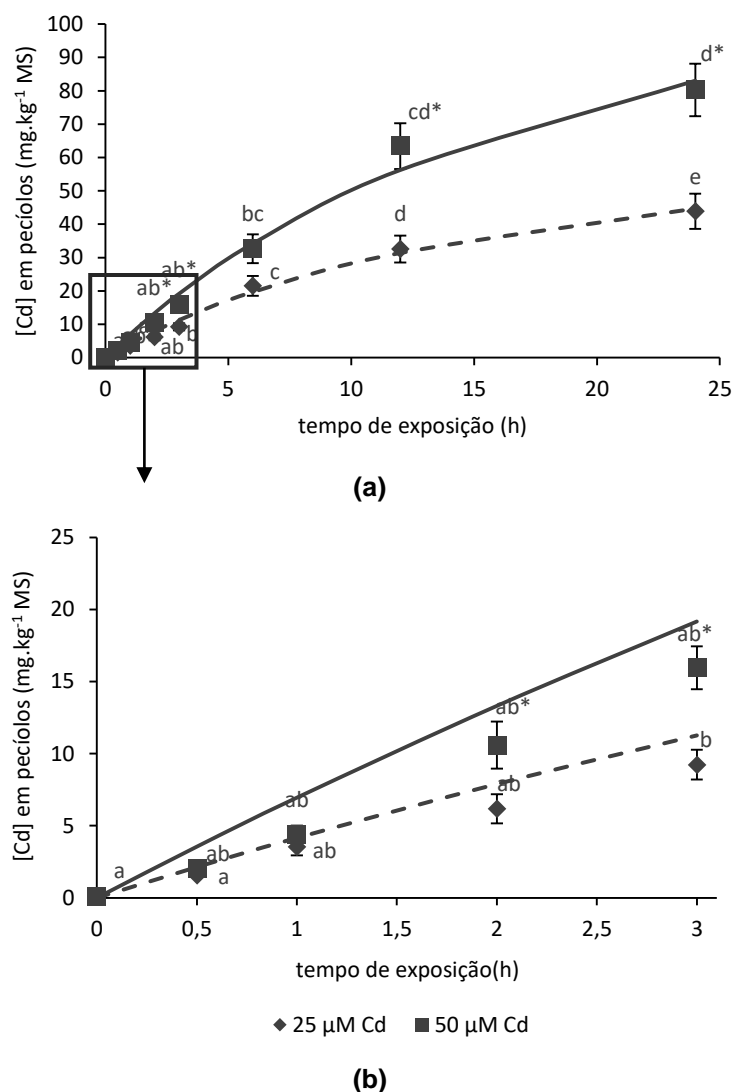


Figura 3.2 - Concentração de Cd (mg kg⁻¹ MS) em pecíolos de espinafre com 40 dias de crescimento, ao longo de 24 h de exposição (a) e nas 3 primeiras horas de exposição (b).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão, diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos para cada contaminação e o asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as duas concentrações estudadas (25 e 50 μM Cd), para cada tempo ($n = 6$).

Ajuste para 25 μM: $C = (C_{\max} \cdot t_{Cd}) / (K_{Cd} + t_{Cd}) = (77,56 t_{Cd}) / (17,66 + t_{Cd})$, $R^2 = 0,9928$. Linha descontinua

Ajuste para 50 μM: $C = (C_{\max} \cdot t_{Cd}) / (K_{Cd} + t_{Cd}) = (158,43 t_{Cd}) / (21,80 + t_{Cd})$, $R^2 = 0,9862$. Linha continua

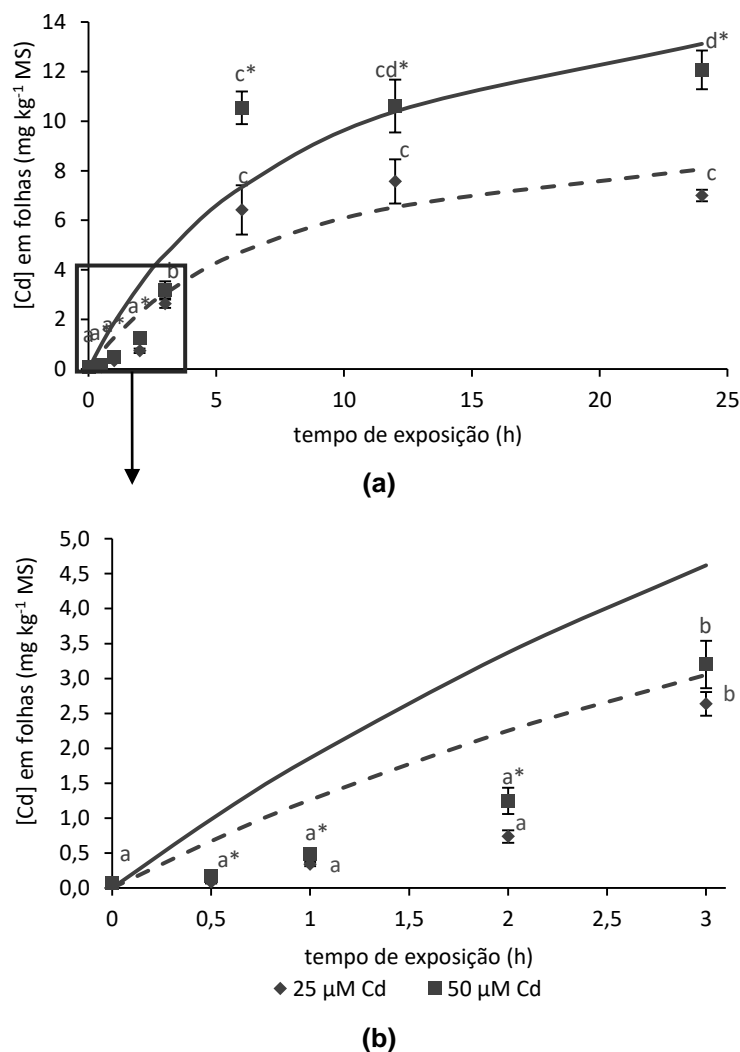


Figura 3.3 - Concentração de Cd ($\mu\text{g kg}^{-1}$ MS) em folhas de espinafre com 40 dias de crescimento, ao longo de 24 h de exposição (a) e nas 3 primeiras horas de exposição (b).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão, diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos para cada contaminação e o asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as duas concentrações estudadas (25 e 50 μM Cd), para cada tempo ($n = 6$).

Ajuste para 25 μM : $C = (C_{\text{max}} \cdot t_{\text{Cd}}) / (K_{\text{Cd}} + t_{\text{Cd}}) = (10,53 t_{\text{Cd}}) / (7,35 + t_{\text{Cd}})$, $R^2 = 0,8883$. Linha descontínua

Ajuste para 50 μM : $C = (C_{\text{max}} \cdot t_{\text{Cd}}) / (K_{\text{Cd}} + t_{\text{Cd}}) = (17,80 t_{\text{Cd}}) / (8,56 + t_{\text{Cd}})$, $R^2 = 0,8963$. Linha continua

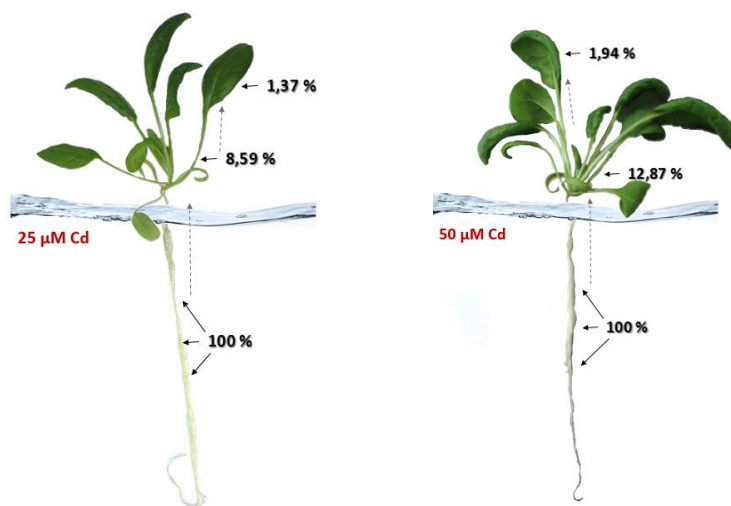


Figura 3.4 - Imagem de plantas de espinafre com 40 dias de crescimento, expostas a 25 e 50 μM de Cd durante 24 h de exposição. Os valores indicados correspondem às percentagens de Cd nos pecíolos e nas folhas em relação à quantidade na raiz (considerada como 100 %).

Na figura 3.1 observa-se que a absorção de Cd pela planta em função do tempo segue uma função hiperbólica. A estas curvas foi efetuado um ajuste de uma equação hiperbólica (análoga à equação de Michaelis-Menten) com o *software* disponível online em www.mycurvefit.com:

$$C = \frac{C_{\text{máx}} \cdot t_{\text{Cd}}}{K_{\text{Cd}} + t_{\text{Cd}}} \quad \text{Eq. (3.1)}$$

em que:

t_{Cd} é o tempo de exposição a uma dada concentração de Cd na solução nutritiva, expressa em horas;

C é a concentração de Cd na planta, expressa em $\text{mg kg}^{-1} \text{MS}$;

$C_{\text{máx}}$ é o patamar de concentração máxima de Cd na planta, expresso em $\text{mg kg}^{-1} \text{MS}$;

K_{Cd} é um coeficiente de acumulação para o Cd, que indica o tempo para o qual se atinge metade do valor de acumulação de Cd na planta (por analogia com a definição do parâmetro K_m da equação de Michaelis-Menten).

Os parâmetros do ajuste efetuado são apresentados na tabela 3.1 e na figura 3.1, para raízes, as linhas correspondem à representação da equação (3.1).



Tabela 3.1 - Parâmetros da equação (3.1) ajustada à acumulação de Cd nas diferentes partes da planta.

	Folha		Pecíolo		Raiz	
	25 μM	50 μM	25 μM	50 μM	25 μM	50 μM
$C_{\text{máx}}$	10,53	17,80	77,56	158,43	540,00	696,76
K_{Cd}	7,35	8,56	17,66	21,80	0,63	0,20
R^2	0,8883	0,8963	0,9928	0,9862	0,9858	0,9610

A partir de duas horas de exposição, a concentração detetada nas raízes é estatisticamente igual ao longo do tempo, observando-se a tendência de se atingir um patamar que corresponderá, como se pode observar na tabela 3.1, aos parâmetros estimados ($C_{\text{máx}}$) de 540,00 mg Cd kg⁻¹ MS para as plantas que cresceram num meio com 25 μM de Cd e de 696,76 mg Cd kg⁻¹ MS para as plantas que cresceram em 50 μM de Cd. A existência deste patamar de saturação é por vezes descrita como indicativa da limitada capacidade de adsorção do Cd à parede celular das células das raízes, que tende a ficar saturada (Hart *et al.*, 1998). No entanto, como se verifica pelos parâmetros da tabela 3.1, esse patamar é diferente para as plantas que se desenvolveram nos meios contendo diferentes concentrações de Cd, isto apesar de, no tempo de 24 h, não se observarem diferenças significativas entre a concentração de Cd nas raízes de plantas que cresceram em ambos os meios. Esta observação pode levar a supor que há o estabelecimento de um equilíbrio entre o Cd nas raízes e o Cd existente na solução nutritiva e que o aumento deste último pode levar a um aumento do Cd nas raízes do espinafre, pelo menos durante um determinado período de tempo.

Devido ao facto das raízes estarem em contacto direto com o meio contaminado, observa-se normalmente uma maior concentração de Cd nas raízes relativamente à parte aérea em diversas plantas, como tem sido verificado por outros autores (Sandálio *et al.*, 2001; De la Rosa *et al.*, 2004; Nedjimi & Daoud, 2009; Molnarova & Fargösova, 2012; Fernández *et al.*, 2013). Nas raízes, os metais, além de se poderem fixar à parede celular, como referido atrás, podem também ficar ligados a exsudados extracelulares ou a outros compostos dentro da célula, formando quelatos e sendo armazenados no vacúolo, permitindo a proteção celular e a retenção de uma elevada concentração de metal na raiz (Rascio & Navari-Izzi, 2011). Sandálio *et al.* (2001), em *Pisum sativum*, exposta a concentrações inferiores a 50 μM de Cd, e Redondo-Gómez *et al.* (2010) em *Arthrocnemum macrostachyum*, exposta a concentrações de Cd inferiores a 1,35 mM, não verificaram efeitos exteriores da fitotoxicidade do Cd, o que



está de acordo com o observado no presente ensaio com *Spinacea oleracea*. Contudo, esses efeitos têm sido descritos, mas para concentrações de Cd superiores a 50 μM e com delineamentos experimentais distintos (Sandálio *et al.*, 2001; Marques & Nascimento, 2013), a resposta da planta depende também de outros fatores como a espécie da planta e o tempo de exposição.

Martinez-Peñalver *et al.* (2012) expuseram *Arabidopsis thaliana* a 50 μM de Cd durante 24 h, verificando uma acumulação de, no máximo, 28 mg Cd kg^{-1} MS de folhas observando, em simultâneo, uma diminuição da concentração de clorofilas. Apesar do ensaio destes autores ser o mais próximo do descrito, os resultados são distintos e em plantas de espinafre foi verificada uma menor concentração de Cd em folhas, tendo por isso sido possível verificar a inexistência de efeitos visíveis de toxicidade nesta planta.

Nas figuras 3.2 e 3.3 apresentam-se os resultados para os teores de Cd nos pecíolos e nas folhas, respetivamente, bem como a curvas de ajustamento à equação (3.1). A concentração de Cd detetada em pecíolos foi superior à das folhas, podendo esta observação estar relacionada com o facto de serem as vias de transporte, responsáveis pela translocação da raiz para as folhas. Em plantas expostas a 25 μM de Cd durante 24 h verificou-se um teor de $43,90 \pm 5,28$ mg Cd kg^{-1} MS nos pecíolos e $7,00 \pm 0,25$ mg Cd kg^{-1} MS nas folhas. Nas plantas sujeitas à concentração de 50 μM , observou-se $80,23 \pm 7,87$ mg Cd kg^{-1} MS nos pecíolos e $12,07 \pm 0,78$ mg Cd kg^{-1} MS nas folhas.

Embora a absorção de Cd pelas raízes e pecíolos tenha um comportamento hiperbólico, o mesmo não é tão evidente nas folhas, onde o R^2 é menor, principalmente na fase inicial das curvas.

Nas folhas há uma acumulação mais lenta no início que tende a aumentar até se atingir um patamar, o que se reflete num ajuste de pior qualidade. Este comportamento demonstra que a translocação das raízes para a parte aérea da planta é retardada e é potenciada pela maior concentração de Cd nas raízes. Provavelmente, esta maior concentração de Cd vai, ao longo do tempo, favorecer o equilíbrio entre o Cd e os transportadores responsáveis pelo deslocamento através do simplasto para a parte aérea. A concentração de Cd em folhas ao longo de 24 h, sendo sempre crescente, tende para uma estabilização dos teores de Cd a partir de 6 h de contaminação (inexistência de diferenças significativas entre os tempos 6, 12 e 24 h), sugerindo uma possível capacidade de acumulação restringida por saturação e pelo estabelecimento de equilíbrios entre o Cd e os transportadores responsáveis pela translocação do Cd da raiz para a parte aérea (Prasad, 2004; Gallego *et al.*, 2012).



Nos pecíolos, nos tempos iniciais (figura 3.2b) observa-se um comportamento praticamente linear, começando depois a estabilizar para tempos mais prolongados. Um ajuste linear da acumulação de Cd nos pecíolos nos tempos iniciais, ou seja, até às 3 h, origina um R^2 de 0,998 (para 25 μM) e de 0,996 (para 50 μM), demonstrando uma relação linear com o tempo na transferência de Cd das raízes para este órgão. Considerando todos os tempos até às 24 h, os resultados para a acumulação de Cd nos pecíolos ajustam-se bem à equação (3.1) como demonstram os parâmetros apresentados na tabela 3.1. Uma vez mais se observa a ocorrência de um patamar de acumulação de Cd superior (dado pelo valor de $C_{\text{máx}}$) para as plantas que cresceram num meio com maior teor de Cd, o que é explicado pelos valores de Cd superiores nas raízes, que levam a uma maior translocação deste metal para a parte aérea.

O coeficiente $C_{\text{máx}}$ é também superior em raiz em comparação com os pecíolos o que é refletido nas percentagens de translocação da figura 3.4 e com as concentrações determinadas em cada órgão. Este coeficiente é também superior quando as plantas são expostas a concentrações de Cd superiores, isto é, quando há maior quantidade de Cd disponível, permitindo uma maior absorção e consequentemente maior translocação para a parte aérea da planta.

O valor de K_{Cd} reflete a “facilidade” a que ocorre a acumulação Cd nas diferentes partes da planta; um valor mais baixo de K_{Cd} indica um tempo menor para o qual se atinge um valor de $C_{\text{máx}}$, o que indica um maior fluxo de acumulação em cada parte da planta. Os valores obtidos para a raiz indicam que é ao nível deste órgão que o fluxo de acumulação é maior, o que está de acordo com as concentrações de Cd verificadas. A comparação com os valores destes parâmetros obtidos para a concentração de Cd na solução nutritiva, também confirma esta indicação. Um comportamento idêntico pode-se também inferir dos valores relativos aos pecíolos e consequentemente às folhas, embora neste caso reflitam a translocação da raiz para a parte aérea e não propriamente o fluxo de absorção.

Os mecanismos de entrada de Cd na planta são diversos, como foram referidos no Cap.I, podendo usar a via apoplástica ou simplástica, atravessar as membranas celulares e entrar nos tecidos da raiz (Prasad, 2004; Clemens, 2006a; Gallego *et al.*, 2012). Contudo, a cinética de absorção pelas raízes pode atingir a saturação quando a quantidade do elemento se torna elevada no meio de crescimento. Embora esta não seja a situação que ocorre nos pecíolos e também nas folhas, o mesmo modelo foi também aplicado aos resultados destes órgãos, permitindo ter uma ideia dos mesmos parâmetros de fluxo do Cd que foram translocados das raízes para a parte aérea (tabela 3.1).



Em solução nutritiva a disponibilidade do Cd é elevada e quase completa pelo que se pode considerar adequada a utilização deste modelo para as raízes, embora a cinética de absorção possa estar dependente de outros fatores, como o tempo (Chen *et al.*, 2008). Nas condições do ensaio, verificou-se um ajuste razoável ao modelo hiperbólico utilizado, tal como indicam os valores de R^2 obtidos, tanto para as raízes como para os pecíolos e folhas.

Apesar da relativamente elevada concentração de Cd nos diferentes órgãos da planta, ela não apresentou sintomas visíveis de toxicidade (figura 3.4). A ausência de danos na planta deve-se, por um lado, à elevada tolerância da planta de espinafre (cujos mecanismos vão ser estudados nos capítulos subsequentes) e por outro lado, ao curto tempo de duração da experiência que leva a que as consequências do stresse induzido possam não se ter ainda manifestado de uma forma visível.

De referir ainda que logo ao fim de 3 h de tempo de exposição, a concentração de Cd nas folhas de espinafre excedeu o limite máximo permitido pela legislação portuguesa em vigor para hortícolas de folha, $0,2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MF}$ (Reg. (CE) nº629/2008). Como se pode observar pela figura 3.1b ao fim deste tempo de exposição as folhas acumularam $2,64 \pm 0,17 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ MS}$ quando sujeitas a $25 \text{ } \mu\text{M}$ de Cd e $3,20 \pm 0,34 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ MS}$ quando sujeitas a $50 \text{ } \mu\text{M}$ de Cd. Estes valores correspondem a $0,26 \pm 0,02 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ MF}$ e $0,32 \pm 0,03 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ MF}$, respetivamente, tendo em atenção os teores de água nas folhas de espinafre (90 %).

3.4. Conclusão

As plantas de espinafre com 40 dias de crescimento e 24 h de exposição ao Cd, apresentaram elevadas concentrações deste metal em raiz, contudo a translocação para a parte aérea foi no máximo 14,87 %, ao fim de 24 h, demonstrando uma elevada capacidade de acumulação na raiz de plantas de espinafre.

Contudo, apesar dos teores elevados de Cd, em 24 h não foram detetados danos exteriores visíveis de stresse, como cloroses, necroses ou alterações no desenvolvimento.

Pelas curvas de absorção obtidas, com ajuste a curvas hiperbólicas ($R^2 > 0,88$), verifica-se que tanto em pecíolos como em raízes a capacidade de acumulação diminui ao longo do tempo. O declive vai diminuindo com o tempo, demonstrando menor capacidade de acumulação, podendo resultar da saturação de transportadores, devido à elevada concentração de Cd e do estabelecimento dos equilíbrios entre o interior da planta e o Cd em solução (Prasad, 2004; Gallego *et al.*, 2012).

Com este ensaio, verificou-se que a planta tem elevada capacidade de acumulação de Cd, contudo fica por esclarecer o que acontece a partir das 24 h e de que forma a capacidade de acumulação varia para tempos mais longos.

Para clarificar os resultados obtidos neste ensaio, e melhor esclarecer a cinética de absorção, realizou-se o ensaio de acumulação de Cd pela planta de espinafre (Cap.IV), onde se expuseram plantas com 30 e 70 dias de desenvolvimento após germinação a concentrações entre 0 e 100 μM de Cd durante 21 dias.

Capítulo IV

Avaliação da capacidade de
acumulação de Cd

Capítulo IV – Avaliação da capacidade de acumulação de Cd

4.1. Introdução

A capacidade de acumular metais demonstrada por uma planta, depende não só da sua espécie mas também das condições de crescimento, tais como o estado de desenvolvimento, o meio de cultura, a concentração de metal aplicada, a forma em que o metal é aplicado e as condições ambientais (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). As plantas com capacidade acumuladora desenvolvem mecanismos que permitem armazenar metais sem que estes interfiram no seu metabolismo e sem comprometer a integridade celular e, consequentemente, a sobrevivência da planta. Tal como descrito no capítulo anterior, algumas plantas têm a capacidade de acumular elevadas concentrações de metais pesados. No caso do Cd consideram-se hiperacumuladores as plantas capazes de acumular mais de 100 mg kg^{-1} MS, na parte aérea (DalCorso *et al.*, 2008; Peralta-Videa *et al.*, 2009; Rascio & Navai-Izzo, 2011; Hassan & Aarts, 2011). O efeito fitotóxico dos metais pesados depende do estado de desenvolvimento das plantas, e pode ser caracterizado pela diminuição da biomassa total das plantas, de comprimentos de parte aérea e raiz, atraso no desenvolvimento (detetado por exemplo pelo número de folhas) e diminuição da concentração de clorofila.

O Cd é facilmente absorvido pelas raízes de plantas e transportado para a parte aérea, podendo causar sintomas de fitotoxicidade, tais como: cloroses, necroses, o enrolamento de folhas (*leaf curling*), o crescimento atrofiado, inibição do crescimento radicular, alterações na ação de estomas, diminuição do potencial de água, alterações das funções da membrana e alterações globais no metabolismo (Sandálio *et al.*, 2001; DalCorso *et al.*, 2010; Mohamed *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013; Choppala *et al.*, 2014).

De entre vários fatores, a concentração de Cd acumulado depende da: (i) disponibilidade do metal na zona radicular; (ii) taxa de transporte do metal para a raiz via simplasto e apoplasto; (iii) proporção de metal fixado na raiz como complexo PC-Cd (fitoquelatinas-cádmio) e acumulado no vacúolo; (iv) taxa de processamento e translocação de Cd no xilema (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

Quando a absorção de Cd ocorre via radicular, a raiz é o primeiro órgão em contacto com o metal. Neste órgão fica retido grande parte do Cd, ligado às paredes celulares ou a quelatos, sendo consequentemente armazenado nos vacúolos, o que pode justificar o facto de na maioria dos casos serem encontradas maiores concentrações de Cd na raiz, relativamente à parte aérea (Prasad, 2004; Gallego *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013). O Cd pode provocar a



diminuição do crescimento radicular, por inibição da divisão e alongamento celular, bem como alterações morfológicas da raiz, devido à proliferação anormal das células (Sánita di Toppi & Gabrielli, 1999; Clemens, 2006a; Martins *et al.*, 2013; Mohamed *et al.*, 2012). Alguns autores indicam como alterações morfológicas, a diminuição de ramificações radiculares e a alteração da coloração radicular para amarela devido à lenhificação e à atividade de algumas enzimas, como polifenoloxidasas, H^+ - ATPases ou enzimas envolvidas na fixação de dióxido de carbono (Sandálio *et al.*, 2001; DalCorso *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2013). As alterações provocadas na raiz podem levar a alterações na absorção de água e nutrientes essenciais, não só devido à diminuição do sistema radicular (menos eficiente), mas também pela alteração do potencial de membrana, provocando consequentemente a diminuição da elasticidade celular (Martins *et al.*, 2013).

Algumas plantas possuem raízes com elevada resistência aos danos provocados por Cd, como a *Phragmites australis*, mesmo expondo as raízes a 100 μM de Cd, não foram observadas quaisquer alterações radiculares (Ederli *et al.*, 2004). Esta planta foi considerada uma planta acumuladora, com capacidade de acumular o metal na raiz mas impedindo a sua translocação para a parte aérea, como estratégia de defesa (Martins *et al.*, 2013).

A nível foliar, um dos principais alvos do Cd é o sistema fotossintético, interferindo direta ou indiretamente nos seus componentes. A diminuição da atividade fotossintética pode ocorrer por redução da área foliar, por inibição da atividade de enzimas responsáveis pela biossíntese de pigmentos fotossintéticos, diminuição da biossíntese de pigmentos fotossintéticos, alteração do sistema de transporte de eletrões e interferência no ciclo de Calvin (Singh & Prasad, 2014; Andresen *et al.*, 2016). O Cd também é conhecido por provocar alterações na atividade estomatal, provocando consequentemente diminuição da taxa de transpiração das plantas (DalCorso *et al.*, 2008; Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

A diminuição da atividade e dimensão de estomas, aumento da espessura do parênquima em paliçada, menor número de células da epiderme e a redução da área foliar são alterações morfológicas que estão fortemente relacionadas com uma menor translocação de elementos essenciais para a parte aérea das plantas (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). Consequentemente as alterações morfológicas e metabólicas referidas podem levar à diminuição do comprimento e da massa da parte aérea da planta, bem como de cloroses, necroses ou mesmo à morte de plantas.

Diferentes estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de identificar plantas com capacidade acumuladora com objetivo de as utilizar em fitorremediação (Pilon-Smits, 2005; Neilson &



Rajakaruna, 2015). Apesar do desenvolvimento de numerosos trabalhos sobre esta temática ao longo dos anos, a variedade de delineamentos experimentais torna, muitas vezes, difícil a comparação entre espécies de modo a avaliar qual será a mais eficaz (Marchiol *et al.*, 2004).

A planta de espinafre, como planta alimentar, não é adequada para a utilização de processos de fitorremediação, pelo que este tipo de ensaios recaem na preocupação face à capacidade de acumulação de Cd na planta e consequentemente na cadeia alimentar. É importante compreender a capacidade de acumulação da planta e verificar se apresenta sinais exteriores de contaminação, de modo a prevenir o seu consumo.

No seguimento do trabalho descrito no Cap.III, pretende-se verificar qual a capacidade acumuladora da planta de espinafre, em tempos mais longos, de modo a avaliar se as concentrações de Cd que esta planta é capaz de absorver, podem comprometer a saúde humana.

O aumento da gama de Cd na solução nutritiva, bem como a utilização de plantas em fases de desenvolvimento distintas, permitiu obter um maior conjunto de fatores que podem interferir na capacidade acumulativa da planta e assim compreender e identificar as limitações dessa acumulação pela planta de espinafre.

4.2. Material e métodos

A metodologia de produção de plantas foi descrita em 2.1.2, na qual se aumentou a gama de concentrações de Cd em solução nutritiva (5, 10, 25, 50 e 100 μM), aumentaram-se os tempos de exposição (0, 2, 6, 13, 17, 21 dias) e fez-se variar o estado de desenvolvimento da planta (plantas jovens 30 dias de crescimento e plantas adultas 70 dias de crescimento), com o objetivo de verificar a capacidade de acumulação da planta ao Cd sem demonstrar danos visíveis.

Neste sentido, as amostras foram colhidas segundo a descrição de 2.2.1., com leitura de clorofila pelo método não destrutivo (2.3.1.) e registo fotográfico. As amostras foram conservadas secas para a determinação de Cd por EAA (2.3.1.).



4.3. Resultados e discussão

4.3.1 Caracterização da acumulação de Cd nas diferentes partes da planta

Nas figuras 4.1 e 4.2 apresentam-se os resultados para as concentrações de Cd nas folhas de plantas jovens e plantas adultas, respetivamente, ao longo do tempo de duração do ensaio e para as diferentes concentrações de Cd na solução nutritiva. As plantas jovens foram capazes de acumular em folhas até $612,72 \pm 31,11$ mg Cd kg⁻¹ MS e as plantas adultas $179,48 \pm 12,39$ mg Cd kg⁻¹ MS, correspondendo à exposição a 100 µM de Cd durante 21 dias. Segundo Peralta-Videa *et al.* (2009), pode-se considerar que a planta em estudo é uma hiperacumuladora, pois foi capaz de acumular mais de 100 mg Cd kg⁻¹ MS na parte aérea, se bem que num ensaio em solução nutritiva, o Cd está muito mais disponível para ser absorvido pela planta.

As plantas jovens em comparação com as plantas adultas, em qualquer dos tecidos analisados, mas em particular na parte aérea, apresentaram maior concentração de Cd para os mesmos tempos de exposição e concentração de Cd em solução nutritiva. Este facto pode estar relacionado com a maior necessidade nutritiva da planta e consequentemente, maior translocação de nutrientes, sendo que o Cd pode ser translocado como tal utilizando os transportadores de outros elementos essenciais, como por exemplo o zinco (Clemens, 2006a; Gallego *et al.*, 2012; Andresen *et al.*, 2016). Por outro lado, o facto de a contaminação ter sido aplicada quando as plantas tinham tamanhos muito diferentes pode levar a que a concentração de Cd nas plantas adultas seja menor devido ao facto de possuírem maior massa.

Em órgãos de plantas controlo, quer foliares, peciolares ou radiculares, a concentração de Cd é residual ou nula (abaixo do limite de deteção do equipamento), não sendo por isso apresentada nos gráficos dos resultados.

Às curvas de acumulação de Cd ao longo do tempo, da figura 4.1 e 4.2 foram ajustadas a curvas hiperbólicas análogas à equação de Michaelis-Menten, equação 3.1, como referido no Cap.III. Estes ajustes são representados pelas linhas das figuras 4.1 e 4.2, e os parâmetros desse ajuste estão presentes nas tabelas 4.1 e 4.2, respetivamente.

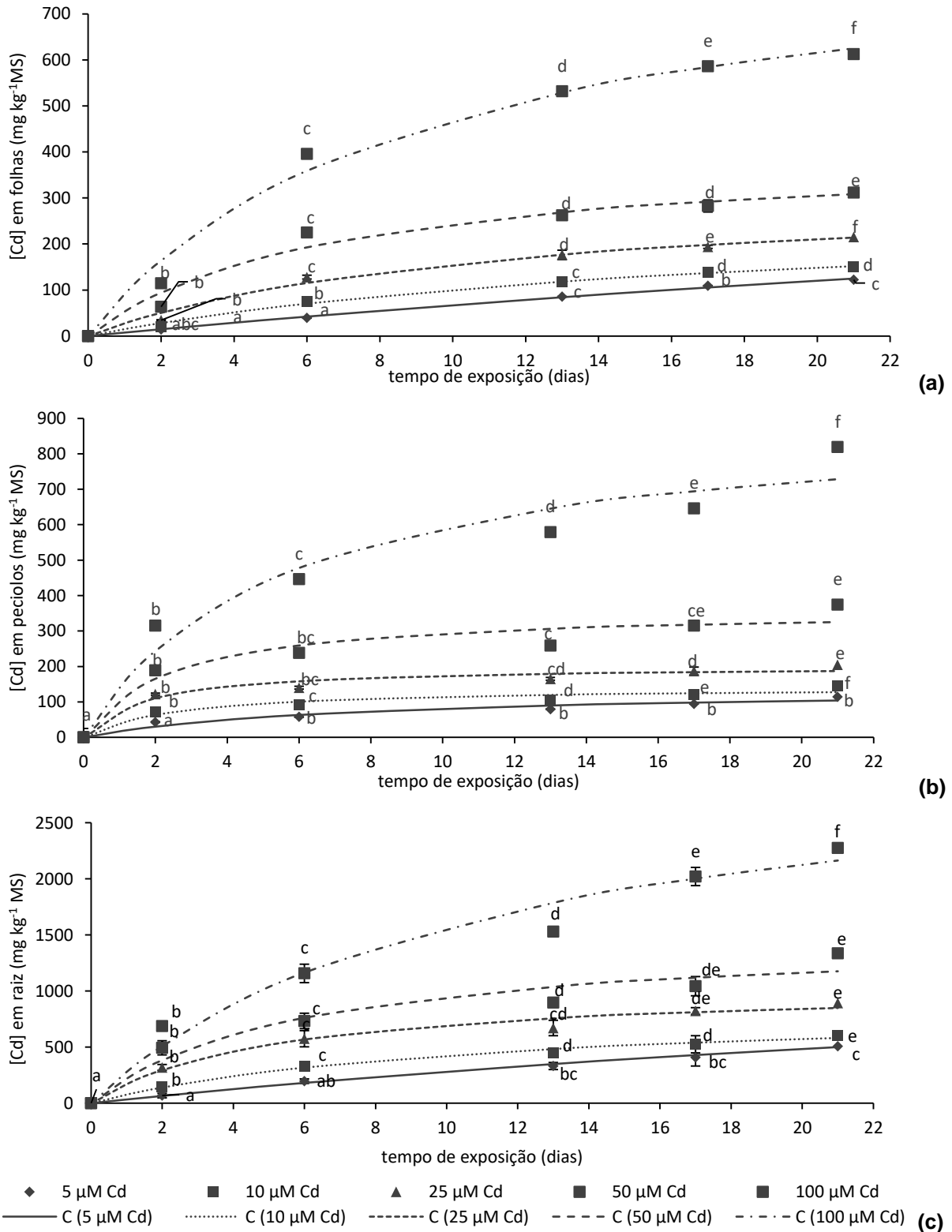


Figura 4.1 - Concentração de Cd em folhas (a), pecíolos (b) e raízes (c) de plantas jovens ao longo de 21 dias de exposição a concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 µM de Cd. As linhas representam os ajustes à equação (3.1), para cada concentração.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada nível de contaminação ($n = 3$).

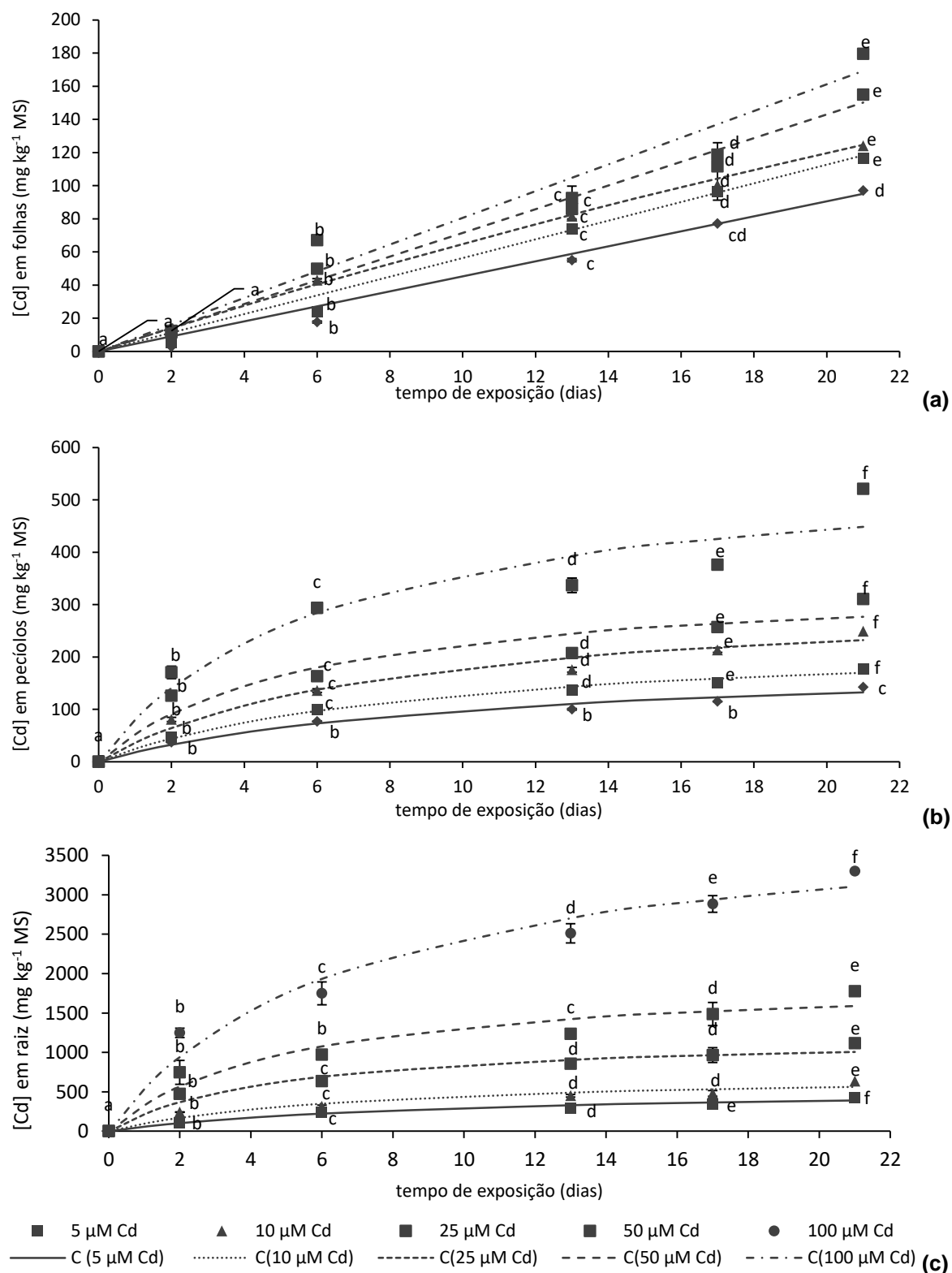


Figura 4.2 - Concentração de Cd em folhas (a), pecíolos (b) e raízes (c) de plantas adultas ao longo de 21 dias de exposição a concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 µM de Cd. As linhas representam os ajustes à equação (3.1), para cada concentração.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e as diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada nível de contaminação ($n = 3$).

Tabela 4.1 - Parâmetros da equação (3.1) ajustada à acumulação de Cd nas diferentes partes de plantas jovens, correspondem às linhas dos gráficos da figura 4.1.

		5 μM	10 μM	25 μM	50 μM	100 μM
Folha	C_{máx}	578,82	282,66	325,36	405,75	888,89
	K_{Cd}	76,34	18,12	10,94	6,64	8,86
	R²	0,9976	0,9950	0,9892	0,9745	0,9884
Pecíolo	C_{máx}	140,10	142,84	201,91	362,15	921,56
	K_{Cd}	7,28	2,51	1,66	2,38	5,57
	R²	0,9491	0,9463	0,9634	0,9326	0,9506
Raiz	C_{máx}	1687,40	873,86	1059,31	1504,95	3295,69
	K_{Cd}	49,76	10,51	5,19	5,86	10,98
	R²	0,9970	0,9935	0,9814	0,9427	0,9682

Tabela 4.2 - Parâmetros da equação (3.1) ajustada à acumulação de Cd nas diferentes partes de plantas adultas, correspondem às linhas dos gráficos da figura 4.2.

		5 μM	10 μM	25 μM	50 μM	100 μM
Folhas	C_{máx}	Ajuste não adequado				
	K_{Cd}					
	R²					
Pecíolo	C_{máx}	196,11	243,03	320,43	352,59	583,46
	K_{Cd}	10,11	9,05	7,98	5,76	6,32
	R²	0,9805	0,994	0,9739	0,9322	0,9306
Raiz	C_{máx}	556,99	745,44	1230,80	1962,13	4101,25
	K_{Cd}	9,01	6,85	4,70	4,94	6,73
	R²	0,9770	0,9379	0,9667	0,9418	0,9724

A acumulação de Cd em folhas de plantas jovens e adultas, não difere apenas no valor absoluto, mas também difere na respetiva progressão consoante os dias e a concentração de Cd na solução nutritiva.

A curva hiperbólica ajustada à acumulação de Cd em folhas de plantas jovens (figura 4.1a) apresenta um elevado coeficiente de determinação para qualquer uma das concentrações de Cd na solução nutritiva ($R^2 \approx 0,99$; tabela 4.1). No entanto, para as plantas adultas, esse ajuste não foi satisfatório (não estando por isso representados os valores na tabela 4.2), pois a variação da concentração de Cd nas folhas de plantas adultas assemelha-se a um comportamento linear. Esta situação deve-se provavelmente a uma maior absorção do Cd



pelas plantas jovens, levando a uma acumulação mais rápida deste metal na parte aérea atingindo uma presumível saturação mais rapidamente. Como foi referido, como a planta adulta está menos carente de nutrientes, o Cd é também absorvido em menor quantidade, pelo que a sua acumulação em folhas é mais lenta. Isto explica, não só os menores teores de Cd nas folhas de plantas adultas mas também a variação linear com o tempo, pois ainda está longe de atingir valores de saturação. Em folhas de plantas jovens, com a exceção das plantas expostas a 5 μM de Cd, a acumulação de Cd (figura 4.1a) é mais rápida nos 6 primeiros dias (declive maior), provavelmente devido à saturação de transportadores, o que não se verifica em plantas adultas pois a concentração de Cd nos tecidos também foi menor (figura 4.2a).

A concentração de Cd nos tecidos da planta aumenta ao longo do tempo, tal como esperado de uma planta acumuladora. Apesar de no ensaio correspondente ao Cap.III, se ter colocado a hipótese de a planta não ter capacidade para acumular mais Cd (devido à saturação de transportadores), com este ensaio, essa hipótese é refutada. Por comparação, com o ensaio de 24 h (Cap.III), folhas de plantas com 40 dias de crescimento expostas a 25 e 50 μM de Cd acumularam $7,00 \pm 0,24 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ MS}$ e $12,07 \pm 0,78 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ MS}$ (figura 3.3) e plantas jovens (30 dias de crescimento) expostas às mesmas concentrações após 48 h de contaminação já continham nos tecidos foliares $34,59 \pm 1,51 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ MS}$ e $63,81 \pm 1,54 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ MS}$ (figura 4.1a), respetivamente. Entre plantas jovens e adultas, verificou-se um aumento de 79,76 % e 81,08 % para 25 e 50 μM de Cd, respetivamente.

A concentração de Cd máxima, acumulada em pecíolos foi de $819,47 \pm 52,73 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ MS}$ em plantas jovens (figura 4.1b) e de $521,04 \pm 12,47 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ MS}$ em plantas adultas (figura 4.2b).

Pelo gráfico da figura 4.1b, verifica-se que a acumulação de Cd em pecíolos segue padrões semelhantes à acumulação em folhas, isto é, para cada concentração observa-se uma absorção mais rápida nos primeiros dias (indicada pelo declive superior), resultando no bom ajustamento a uma hiperbólica com $R^2 \geq 0,93$ (tabela 4.1). Ao contrário do que se observou em folhas de plantas adultas (figura 4.2b), o coeficiente de determinação que permite avaliar o ajustamento da curva a uma hiperbólica, é elevado ($0,93 \geq R^2 \leq 0,99$; tabela 4.2).

Como se pode observar nas figuras 4.1c e 4.2c a concentração de Cd na raiz é muito superior quando comparada com a concentração na parte aérea, tal como descrito por outros autores (Sandálio *et al.*, 2001; De la Rosa *et al.*, 2004; Nedjimi & Daoud, 2009; Molnarova & Fargosova, 2012; Fernández *et al.*, 2013). Ao dia 21 em plantas contaminadas com 100 μM de Cd, as raízes de plantas jovens apresentaram $2275,74 \pm 175,28 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ MS}$, ou seja,



61,4 % de todo o Cd na planta. Por outro lado, as raízes de plantas adultas apresentaram $3300,00 \pm 105,58 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$, ou seja, 82,5 % de todo o Cd na planta. A maior concentração de Cd em raiz deve-se ao facto de, neste caso, ser o primeiro órgão em contacto com o Cd, ficando grande parte retido nesta, ligado às paredes celulares ou a quelatos que podem depois ser armazenados nos vacúolos (Hasanuzzaman *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2013).

A concentração de Cd na raiz, tal como verificado no ensaio do Cap.III, é superior face aos restantes tecidos, mas neste ensaio foi ainda possível verificar que a percentagem de translocação para a parte aérea varia com o estado de desenvolvimento da planta.

A concentração de Cd nas raiz foi superior em plantas adultas, enquanto que nas folhas foi superior em plantas jovens, além disso a diferença das concentrações de Cd entre as modalidades de crescimento, foi menor nas raízes do que nas folhas. Estes factos podem estar relacionados com a maior capacidade de retenção de Cd por raízes pelas plantas adultas e simultaneamente maior translocação pelas plantas mais jovens, nutricionalmente mais exigentes. Em plantas hiperacumuladoras a translocação do metal para a parte aérea é uma estratégia importante para manter a capacidade de acumulação de elevadas concentrações (Martins *et al.*, 2013), uma vantagem relevante em plantas utilizadas em fitorremediação, mas um problema quando se refere a uma planta alimentar.

Pelos gráficos das figuras 4.1c e 4.2c, verificam-se semelhanças entre as curvas de concentração para cada tipo de contaminação. Existe um aumento da concentração de Cd ao longo do tempo, sendo este aumento mais rápido nos primeiros dias (de dia 0 a 6) e mais lento para os restantes, apresentando um menor declive. A diminuição do declive ao longo do tempo pode estar relacionada com a saturação de transportadores, responsáveis pela absorção de Cd pelas raízes. O ajustamento de curvas hiperbólicas a estes dados experimentais apresentou sempre elevados coeficiente de determinação ($R^2 \geq 0,94$; tabelas 4.1 e 4.2).

Nas tabelas 4.1 e 4.2, tal como referido anteriormente, estão presentes os parâmetros de ajuste, com coeficientes de determinação sempre superiores a 0,93. O coeficiente C_{\max} , que representa o patamar de concentração máxima de Cd absorvido pela planta é superior em raiz de plantas jovens, relativamente a folhas e pecíolos, tal como verificado no Cap.III. Em plantas jovens este coeficiente aumenta com o aumento da concentração de Cd na solução nutritiva, com a exceção da concentração de $5 \mu\text{M}$ de Cd que, para folhas e raízes, apresenta C_{\max} inferior apenas a $100 \mu\text{M}$ de Cd. Em plantas adultas, pecíolos e raiz, o C_{\max} aumenta com o aumento da concentração de Cd a que se expôs a planta.



O K_{Cd} reflete a velocidade com que ocorre a acumulação de Cd nas diferentes partes da planta. Nas raízes de plantas adultas o K_{Cd} é inferior em relação às plantas jovens, indiciando uma maior velocidade de absorção radicular de Cd, no entanto, nos pecíolos ocorre o inverso o que denota uma mais lenta translocação para a parte aérea por parte das plantas adultas, o que estará relacionado com a maior necessidade de nutrientes da parte aérea das plantas jovens.

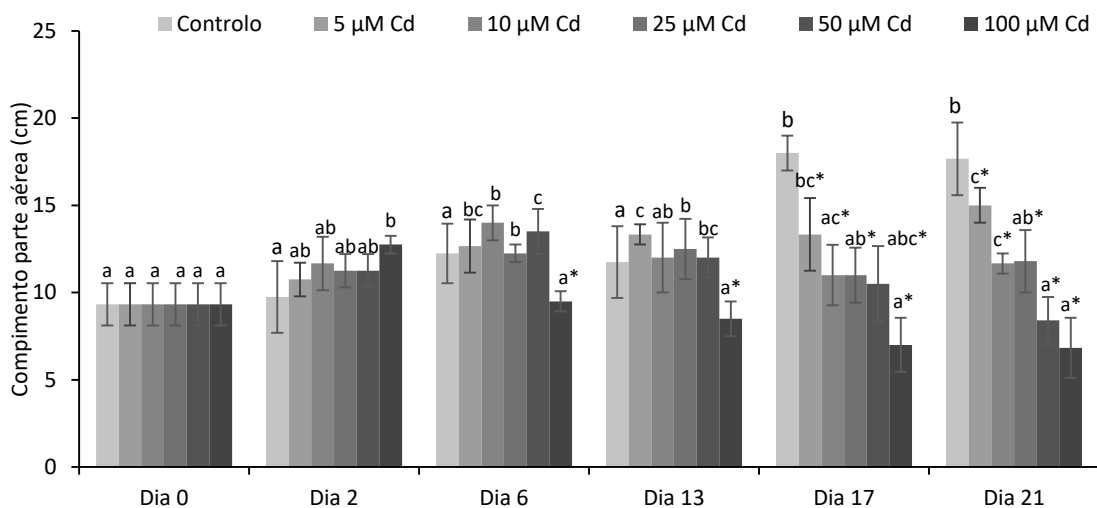
4.3.2 Avaliação de parâmetros vegetativos de plantas expostas ao Cd

Vários autores têm descrito efeitos do Cd no crescimento e aspeto exterior de plantas, neste sentido pretendeu-se avaliar de que modo o Cd afetava alguns parâmetros vegetativos, tais como o número de folhas, os comprimentos e as massas de parte aérea e raiz, a biomassa total e a concentração de clorofila (Sandálio *et al.*, 2001; Dandan *et al.*, 2011; Molnárová & Fargasová, 2012; Fernández *et al.*, 2013; Marques & Nascimento, 2013; Singh & Prasad, 2014).

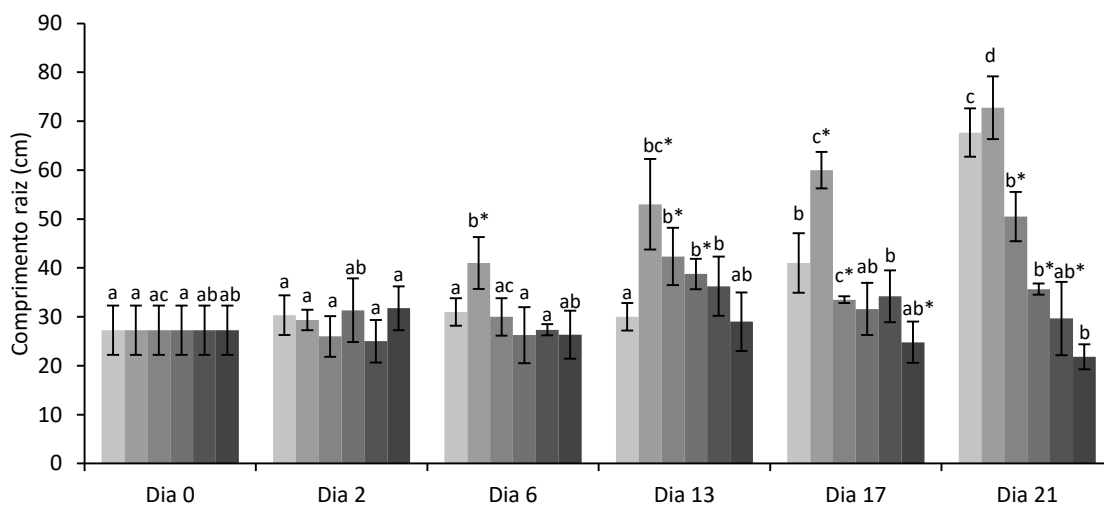
Na figura 4.3 e 4.4 apresentam-se os resultados para plantas jovens e adultas, respetivamente, do comprimento da parte aérea e da raiz das plantas de espinafre, em função do tempo e da concentração de Cd na solução nutritiva. Verifica-se que os comprimentos da parte aérea e raiz de plantas jovens aumentaram ao longo dos 21 dias, com a exceção de plantas expostas a 50 e 100 μM de Cd. Ao 17º e 21º dia de exposição o comprimento da parte aérea de plantas contaminadas foi estatisticamente inferior face às plantas controlo, enquanto que para os mesmos dias de exposição o comprimento da raiz é superior ao controlo em plantas expostas a 5 μM de Cd. Apesar da exposição ao Cd afetar negativamente o comprimento da planta, parece existir um estímulo de crescimento da raiz quando esta é exposta a concentrações mais baixas. Este efeito hormético encontra-se descrito para muitas situações de toxicidade com metais pesados e, embora não seja bem conhecido, provavelmente deve-se a uma resposta de defesa da planta que, além de conseguir contrariar o efeito tóxico do metal, pode levar a uma melhoria geral do estado da planta que leva a um maior desenvolvimento mas de uma forma transiente (Pinto *et al.*, 2009; Sobrino-Plata *et al.*, 2014). A presença de Cd pode provocar alterações no potencial de membrana, perturbando a absorção de água e nutrientes essenciais (Sandálio *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2013). A baixa quantidade de Cd no meio pode desencadear esta perturbação, mas pode simultaneamente permitir que a planta desenvolva o sistema radicular de modo a contornar esta situação, contudo quando as concentrações de Cd a que é exposta são maiores, acabar



por perder esta capacidade. Os comprimentos de raiz são significativamente inferiores, em relação ao controlo, só acontecem para concentrações de Cd de 100 μM ao fim de 17 dias, e para concentrações de 10, 25 e 50 μM de Cd ao fim de 21 dias, em plantas jovens.



(a)



(b)

Figura 4.3 - Comprimento da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas jovens expostas a 0 (controlo), 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd ao longo de 21 dias.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão, diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada nível de contaminação e o asterisco representa diferenças estatisticamente significativas entre plantas contaminadas e controlo, para cada dia ($n = 6$).

No gráfico da figura 4.4, verifica-se que o comprimento da parte aérea de plantas adultas, diminui significativamente, em plantas contaminadas com 100 μM de Cd, a partir do 13º dia de exposição, com concentração de Cd nas folhas igual ou superior a $92,56 \pm 1,37 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$. O comprimento da raiz também é afetado em plantas contaminadas com Cd, com diferenças estatisticamente significativas, face ao controlo, quando expostas a 100 μM de Cd e com uma concentração na raiz, igual ou superior a $2511,72 \pm 94,72 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$.

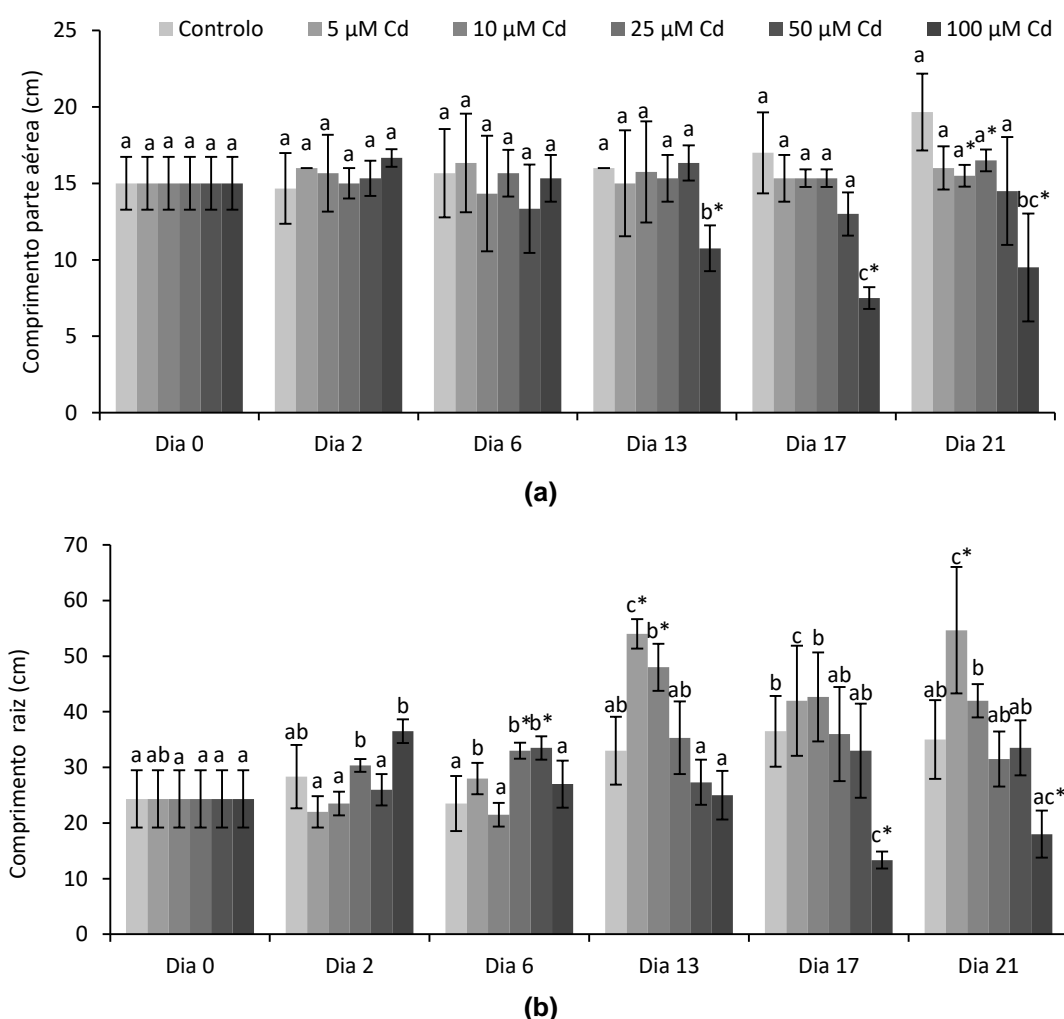


Figura 4.4 - Comprimento da parte aérea (a) e da raiz (b) de plantas adultas expostas a 0 (controlo), 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd ao longo de 21 dias.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão, diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada nível de contaminação e o asterisco representa diferenças estatisticamente significativas entre plantas contaminadas e controlo, para cada dia ($n = 6$).



Outros autores também têm observado, noutras plantas, que o aumento de Cd leva à diminuição do crescimento radicular (Sandálio *et al.*, 2001; Dandan *et al.*, 2011; Marques & Nascimento, 2013; Singh & Prasad, 2014) bem como da parte aérea (Fernández *et al.*, 2013; Marques & Nascimento, 2013). Além de Cd provocar a repressão no crescimento da raiz de plantas adultas para concentrações de Cd mais elevadas, existe simultaneamente um estímulo em plantas expostas a concentrações mais baixas de Cd.

Nas figuras 4.5 e 4.6 apresentam-se os dados de biomassa para plantas jovens e adultas, respetivamente. Em plantas jovens contaminadas, a biomassa total (figura 4.5c) diminuiu significativamente face ao controlo, ao 13º dia de exposição, consequência da diminuição significativa da massa da parte aérea (figura 4.5a). A massa da raiz (figura 4.5b) também apresenta um comportamento de diminuição na presença de Cd, que é estatisticamente significativo ao 21º dia de contaminação a 25, 50 e 100 µM. A diminuição das massas pode estar relacionada com a alteração do balanço de água, pois o Cd pode levar a uma absorção deficiente desta (Martins *et al.*, 2013).

As massas de plantas adultas (figura 4.6) apresentam elevados desvios padrão devido à enorme variabilidade de crescimento, que vai aumentando com o desenvolvimento das plantas, podendo mascarar os efeitos tóxicos do Cd no crescimento.

Pelo gráfico da figura 4.6a, verifica-se que a massa de plantas controlo aumenta ao longo do tempo refletindo o crescimento normal da planta. Em plantas contaminadas esse crescimento é menos evidente, existindo diferenças significativas em plantas contaminadas face ao controlo, a partir do 13º dia. Sandálio *et al.* (2001), Nedjimi & Daoud (2009) e Singh & Prasad (2014), também observaram a diminuição da massa de folhas com o aumento da concentração de Cd em plantas de *Pisum sativum*, *Atriplex alimus* e *Solanum melongena*, respetivamente, contudo De la Rosa *et al.* (2004), não detetaram diferenças significativas na massa de folhas de *Salsosa Kali* exposta a aproximadamente 178 µM de Cd durante 15 dias. A massa da raiz (figura 4.6b) de plantas adultas não variou significativamente com o tempo, mas foi negativamente afetada quando expostas a concentrações de 100 µM de Cd. Nedjimi & Dauod (2009), bem como Sandálio *et al.* (2001) verificaram a diminuição da massa da raiz quando a planta é exposta a concentrações iguais ou superiores 50 µM de Cd, em *Salsosa Kali* e *Atriplex halimus*, que apesar de pertencerem à mesma família que *Spinacea oleracea*, demonstraram-se plantas mais sensíveis.

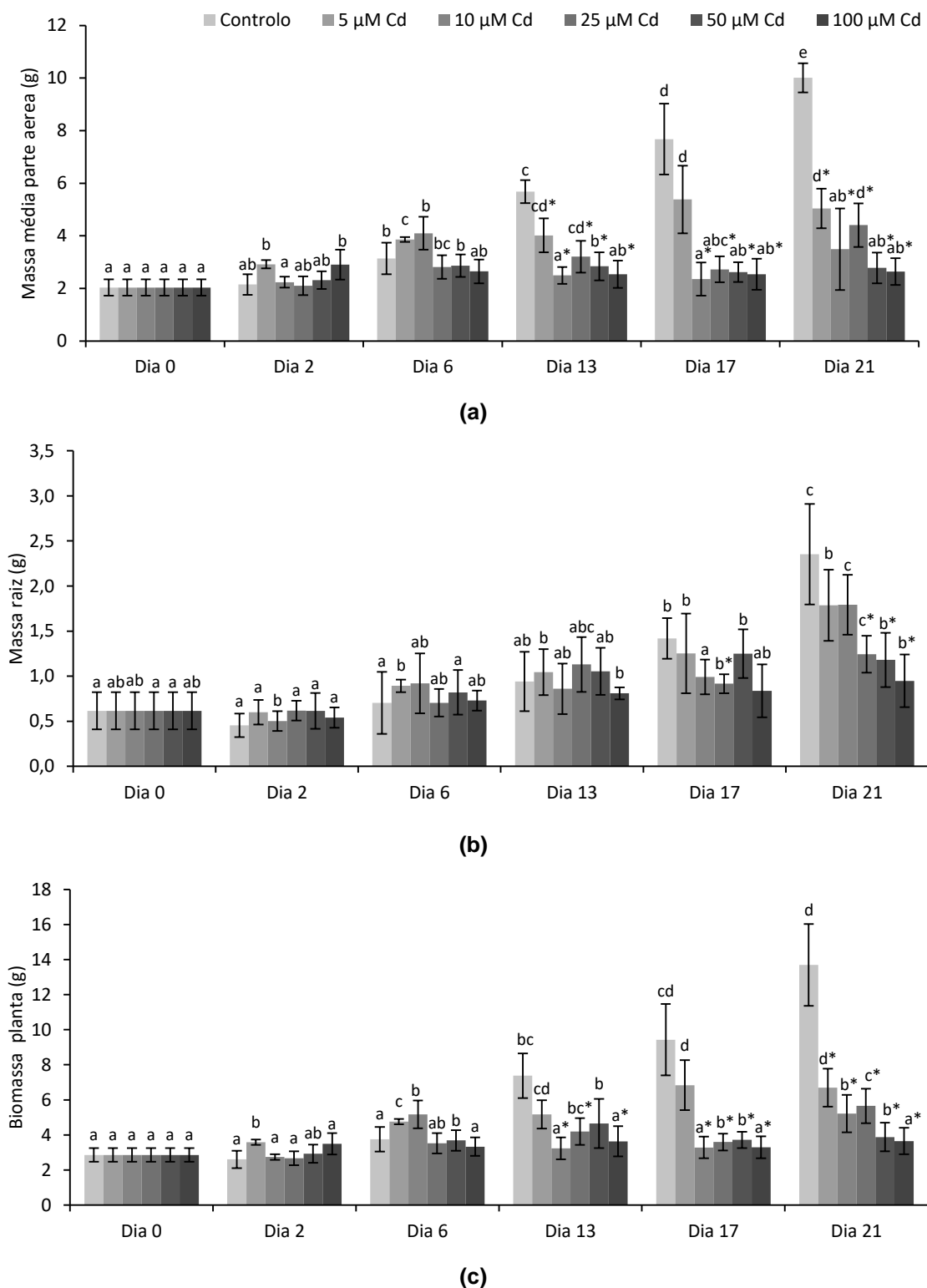


Figura 4.5 - Massa da parte aérea (a), da raiz (b) e biomassa total (b) de plantas jovens, expostas a 0 (controlo), 5, 10, 25, 50 e 100 µM de Cd ao longo de 21 dias.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão, diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada nível de contaminação e o asterisco representa diferenças estatisticamente significativas entre plantas contaminadas e controlo, para cada dia ($n = 6$).

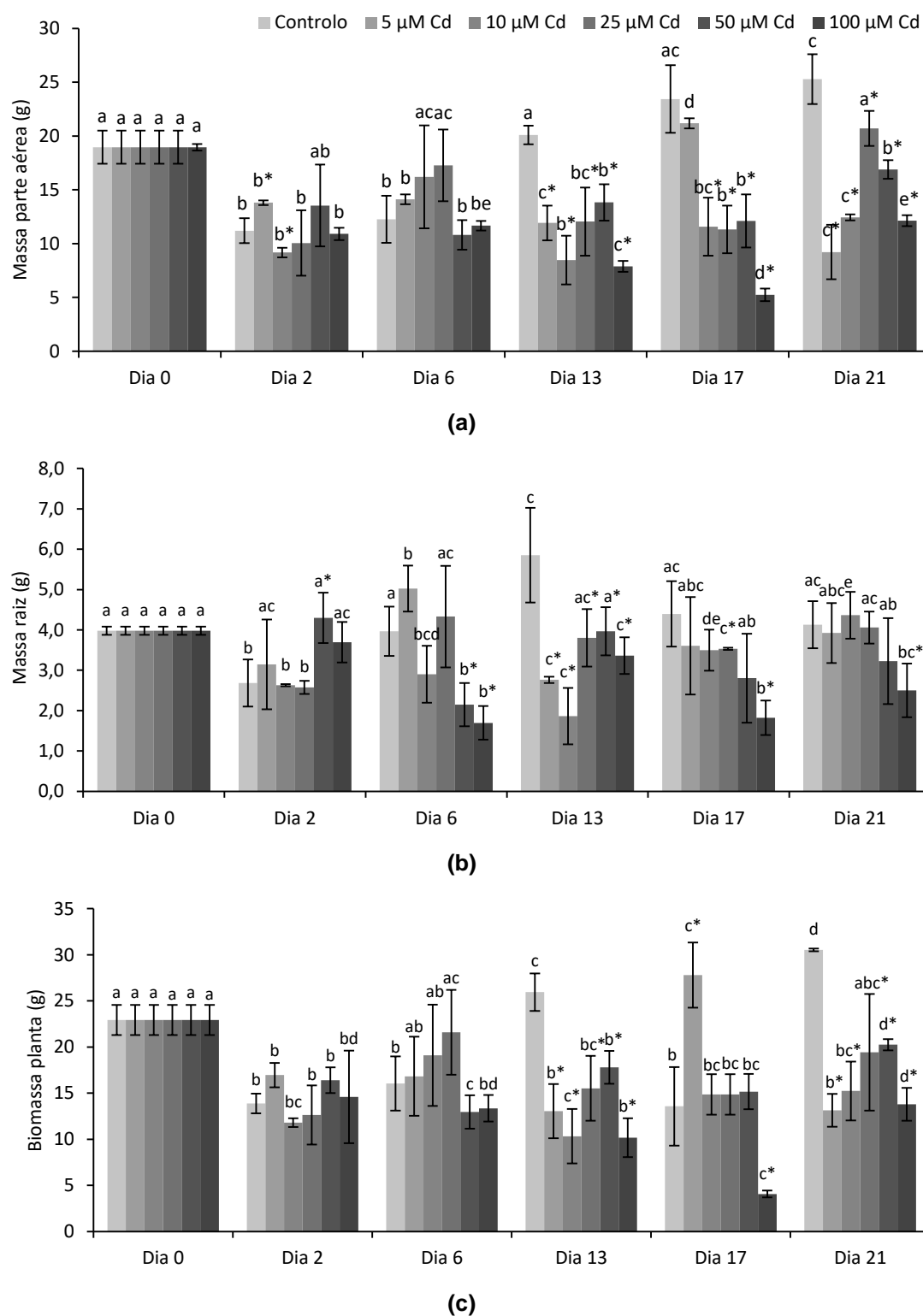


Figura 4.6 - Massa da parte aérea (a), da raiz (b) e biomassa total (b) de plantas adultas, expostas a 0 (controlo), 5, 10, 25, 50 e 100 μ M de Cd ao longo de 21 dias.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão, diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada nível de contaminação e o asterisco representa diferenças estatisticamente significativas entre plantas contaminadas e controlo, para cada dia ($n = 6$).



A biomassa total de plantas adultas (figura 4.6c) como reflexo das massas da parte aérea e raiz, apresenta um comportamento crescente para plantas controle e uma tendência para menores valores em plantas contaminadas. As diferenças menos evidentes, entre plantas adultas contaminadas e controle (figura 4.6c), quando comparadas a plantas jovens (figura 4.5c), deve-se não só à variabilidade de crescimento mas também a uma maior resistência a alterações no balanço de água dos tecidos, devido ao estado desenvolvimento mais avançado.

De modo a facilitar a interpretação dos resultados dos parâmetros vegetativos apresentados, utilizou-se o índice de tolerância (IT) que permite a comparação de cada parâmetro com controle. As figuras 4.7 e 4.8 referem-se ao IT de plantas jovens e adultas, respectivamente.

Na figura 4.7 (IT plantas jovens) verifica-se que no dia 2 e dia 6 não existem, ou são pontuais, diferenças significativas entre plantas controle e contaminadas.

Ao 13º dia de exposição, verificam-se os primeiros efeitos do Cd nos comprimentos e massas das plantas contaminadas. O comprimento da parte aérea, a massa da parte aérea e consequentemente a biomassa total de plantas expostas a 100 μM de Cd são afetados negativamente pela exposição ao Cd. Por outro lado, plantas expostas a 5, 10 e 25 μM de Cd apresentaram um estímulo de crescimento radicular (cm).

Aos dias 17 e 21, todos os parâmetros demonstraram ser afetados negativamente pela presença de Cd.

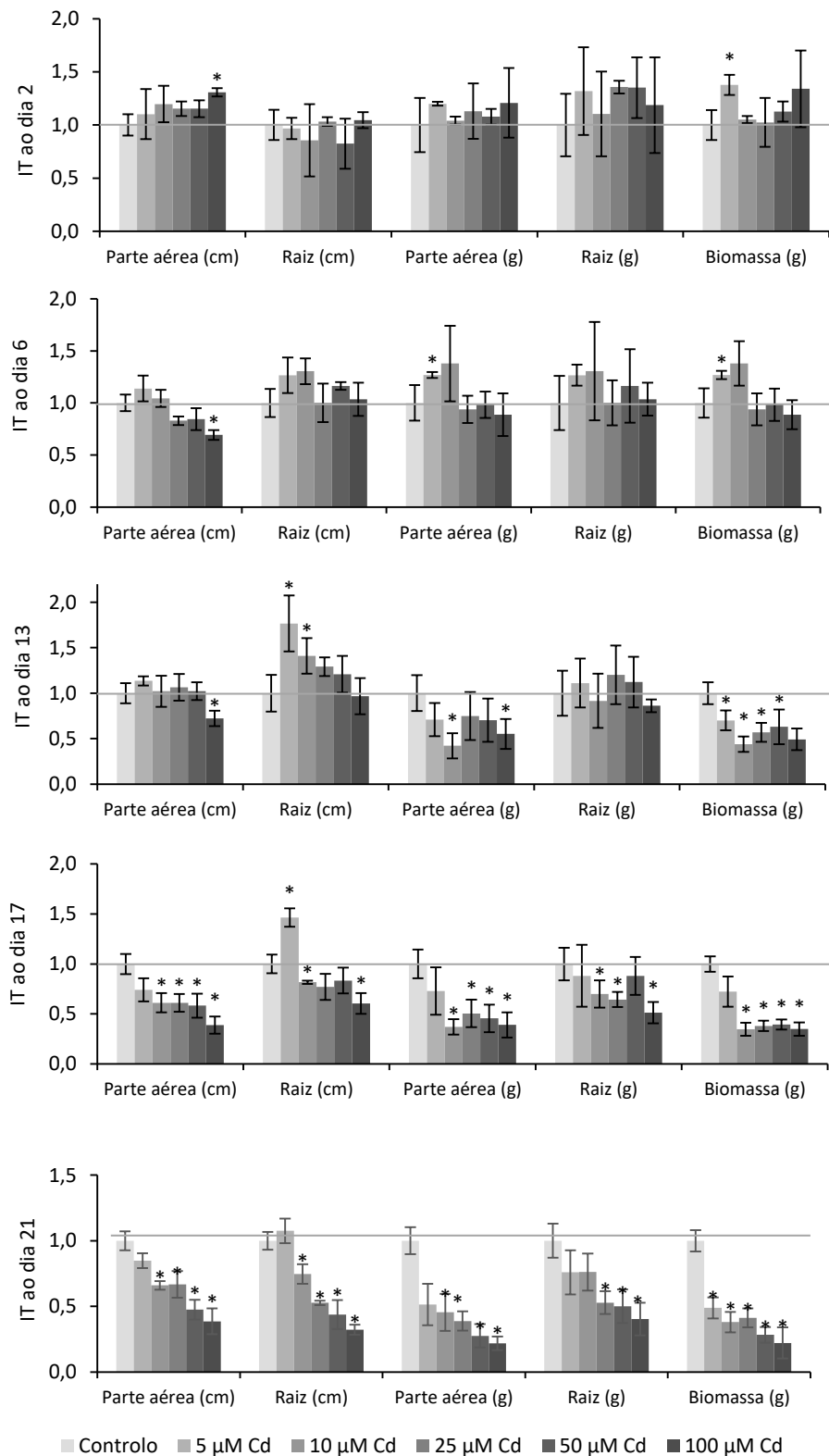


Figura 4.7 - Índice de Tolerância das plantas jovens de espinafre expostas a 0 (controlo), 5, 10, 25, 50 e 100 µM de Cd, de cada parametro vegetativo e referente a cada dia de exposição.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e o asterisco representa diferenças estatisticamente significativas entre plantas contaminadas e controlo, para cada dia (n =6).

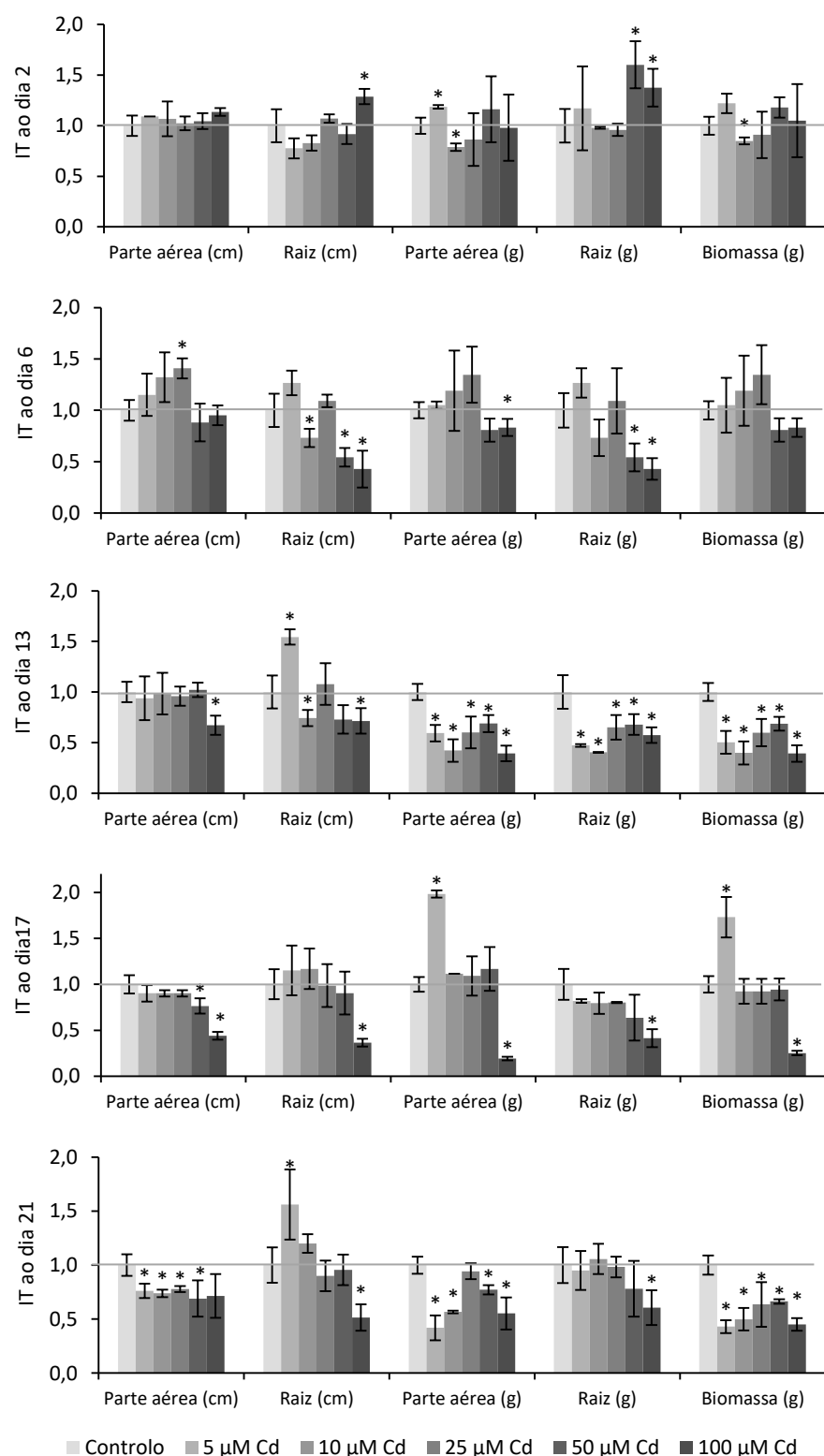


Figura 4.8 - Índice de Tolerância das plantas adultas de espinafre expostas a 0 (controle), 5, 10, 25, 50 e 100 µM de Cd, de cada parametro vegetativo e referente a cada dia de exposição.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e o asterisco representa diferenças estatisticamente significativas entre plantas contaminadas e controle, para cada dia (n =6).

Na figura 4.8 (IT plantas adultas) verifica-se, tal como descrito anteriormente, que as plantas expostas a 100 μM foram as que apresentaram menor índice de tolerância. O efeito negativo do Cd sobre estas plantas é identificado a partir de dia 6, apresentando maior expressão para tempos de exposição superiores.

Na tabela 4.3 apresenta-se o número de folhas por planta. Verifica-se que o número de folhas aumenta ao longo do tempo para qualquer modalidade de contaminação, tanto em plantas jovens como em plantas adultas. Em plantas jovens controlo, o número de folhas variou de 5 a 11, enquanto em plantas contaminadas com 10 e 25 μM de Cd foi <10 e em plantas contaminadas com 50 e 100 μM de Cd foi <9 . Em plantas adultas controlo o número de folhas variou de 12 a 17, enquanto em plantas contaminadas foi <16 . A diminuição do número de folhas quando as plantas são expostas a Cd representa inibição de desenvolvimento, a planta utiliza parte da energia produzida para controlar o stresse induzido por Cd, e não para o seu desenvolvimento. No entanto, apesar de se notar algum decréscimo no número de folhas, as diferenças observadas entre contaminações não são significativas nem para as concentrações mais elevadas de Cd.

Tabela 4.3 - Número médio de folhas de plantas colhidas em cada dia de ensaio.

O símbolo \pm corresponde ao desvio padrão, diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada nível de contaminação e o asterisco representa diferenças estatisticamente significativas entre plantas contaminadas e controlo, para cada dia ($n = 6$).

Plantas Jovens	Dia 0	Dia 2	Dia 6	Dia 13	Dia 17	Dia 21
Controlo	5 ± 1 a	6 ± 1 a	6 ± 2 a	7 ± 1 ab	9 ± 1 bc	11 ± 2 c
5 μM Cd	5 ± 1 a	6 ± 1 ab	7 ± 1 ab	7 ± 1 bc	9 ± 1 c	11 ± 2 d
10 μM Cd	5 ± 1 a	6 ± 1 a	7 ± 1 a	7 ± 1 a	8 ± 2 ab	10 ± 2 b
25 μM Cd	5 ± 1 a	5 ± 1 a	7 ± 1 ab	8 ± 1 b	8 ± 1 bc	10 ± 2 c
50 μM Cd	5 ± 1 a	5 ± 1 a	6 ± 1 a	8 ± 1 b	9 ± 1 b	9 ± 1 b
100 μM Cd	5 ± 1 a	6 ± 1 a	6 ± 1 a	8 ± 1 b	8 ± 1 b	9 ± 1 b

Plantas Adultas	Dia 0	Dia 2	Dia 6	Dia 13	Dia 17	Dia 21
Controlo	12 ± 1 ab	13 ± 2 ab	12 ± 2 ab	14 ± 1 bc	15 ± 2 bc	17 ± 2 c
5 μM Cd	12 ± 1 a	13 ± 1 a	15 ± 0 a	15 ± 3 a	13 ± 2 a	14 ± 1 a
10 μM Cd	12 ± 1 a	14 ± 1 ab	14 ± 2 ab	14 ± 1 ab	15 ± 1 b	16 ± 2 b
25 μM Cd	12 ± 1 a	11 ± 2 a	15 ± 2 ab	17 ± 3 b	15 ± 1 ab	16 ± 1 ab
50 μM Cd	12 ± 1 a	14 ± 2 a	15 ± 3 a	14 ± 3 a	14 ± 3 a	16 ± 1 a
100 μM Cd	12 ± 1 a	11 ± 1 a	15 ± 4 a	13 ± 3 a	15 ± 2 a	16 ± 1 a

Na figura 4.9 apresentam-se os resultados dos teores de clorofila nas folhas de espinafre. Verifica-se que a concentração de clorofila não varia significativamente entre plantas controlo e contaminadas, com a exceção dos dias 17 e 21 em plantas jovens (figura 4.9a). As plantas jovens ao dia 17, apresentaram concentrações de clorofila significativamente mais baixas quando expostas a 5, 10 e 25 μM de Cd e ao dia 21 quando expostas a 5, 10, 25 e 50 μM de Cd, tal como se verifica visualmente nas figuras A2 em anexo. As plantas jovens contaminadas com 100 μM de Cd não apresentaram diferenças estatisticamente significativas face ao controlo.

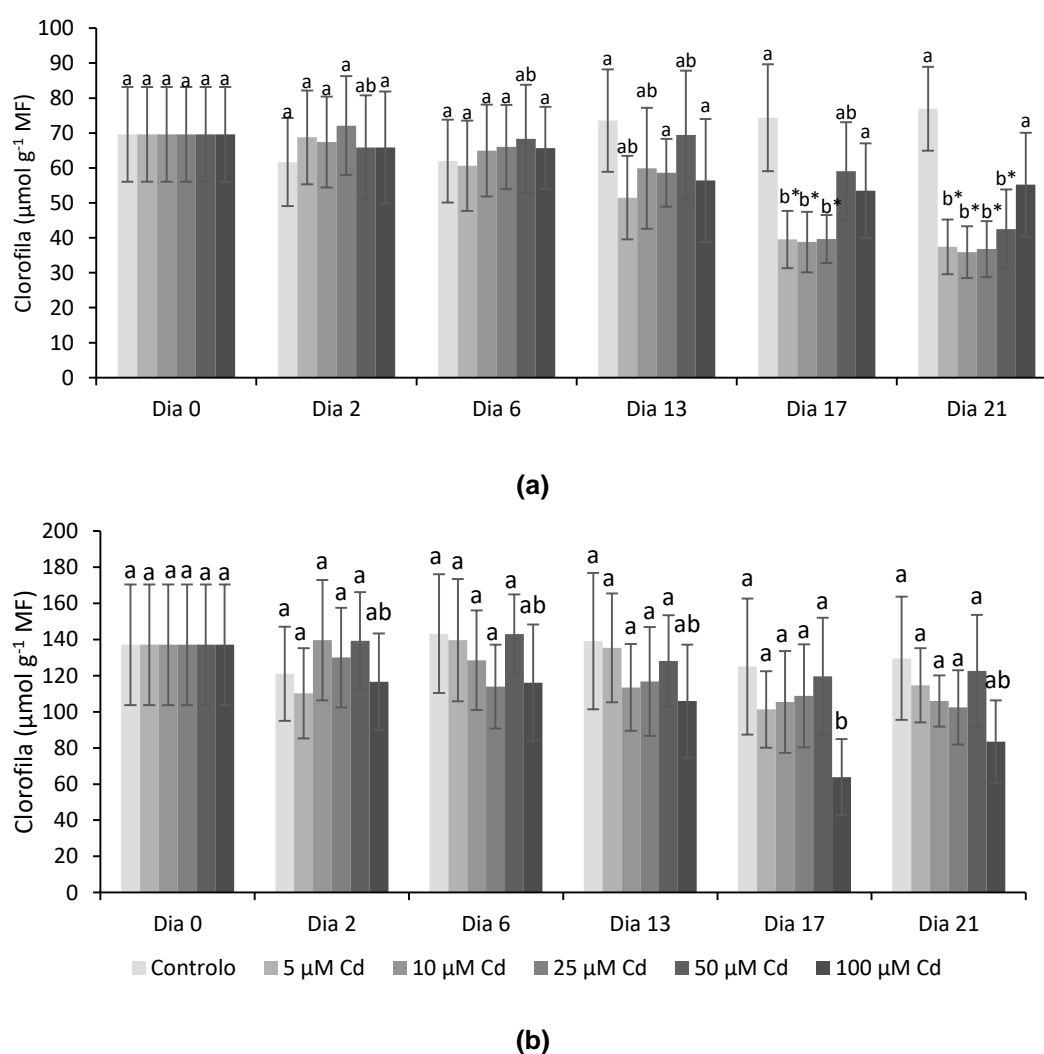


Figura 4.9 - Concentração de clorofilas (em $\mu\text{mol g}^{-1}$) em plantas jovens (a) e plantas adultas (b) expostas a 0 (controlo), 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd ao longo de 21 dias.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão, diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada nível de contaminação e o asterisco representa diferenças estatisticamente significativas entre plantas contaminadas e controlo, para cada dia ($n = 36$).



Pela figura 4.10 é possível verificar em folhas de plantas jovens contaminadas com 5, 10, 25 e 50 μM de Cd durante 21 dias o aparecimento de cloroses. Contudo, uma coloração verde intensa não só em plantas jovens controlo, mas também em plantas contaminadas com 100 μM de Cd, foi observada. A coloração verde intensa em plantas contaminadas com 100 μM de Cd pode resultar de uma mesma quantidade de clorofila numa menor área foliar, e apesar de não se verificarem cloroses nas folhas verificam-se necroses.

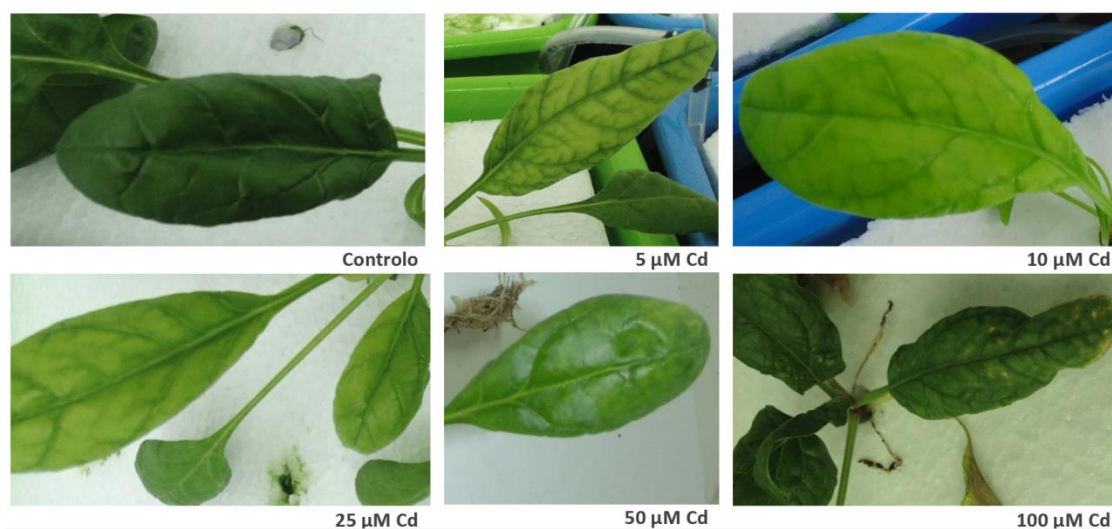


Figura 4.10 - Folhas de plantas jovens expostas a 0 (controlo), 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd durante 21 dias.

Em plantas adultas, a concentração de clorofila apresentada na figura 4.9b não demonstra diferenças significativas entre plantas controlo e contaminadas, contudo verifica-se que o valor médio é menor em plantas contaminadas com 100 μM de Cd ao dia 17 e 21. Este facto foi verificado visualmente no decorrer do ensaio, sendo observadas não só cloroses como também necroses em plantas adultas expostas a 100 μM de Cd durante 21 dias, tal como demonstram as imagens da figura A4 em anexo.

A grande dispersão dos resultados, evidenciada pelos elevados desvios padrão, não permite tirar conclusões mais definitivas.

Em anexo estão também presentes imagens das plantas jovens e adultas ao 6º dia de contaminação, de modo a confirmar que visualmente as diferenças entre colorações também não foram detetadas para tempos de exposição mais curtos (figura A1 e figura A3, respetivamente).



Outros autores têm detetado uma diminuição na clorofila com o aumento da concentração de Cd. Marques & Nascimento (2013) verificaram, em *Jatropha curcas*, diferenças significativas na concentração de clorofila de plantas contaminadas com Cd em concentrações de 40 μM . Sandálio *et al.* (2001) verificaram diferenças significativas em *Pisum sativum*, face ao controlo, a partir de 50 μM de Cd e Nedjemi & Daoud (2009) em *Atriplex halimus* a partir de 100 μM de Cd.

A diminuição dos teores de clorofila em plantas contaminadas com Cd tem sido explicada pela diminuição da síntese destes pigmentos ou pela degradação das moléculas de clorofila existentes. No presente trabalho, em plantas adultas apenas nas concentrações mais elevadas de Cd estes efeitos foram detetados, por outro lado em plantas jovens ao fim de 21 dias já se observavam cloroses, mesmo em plantas contaminadas com 5 μM (figura 4.10).

Além da alteração visual da coloração das folhas e de comprimentos das plantas, foi também possível detetar visivelmente alterações ao nível radicular. Nas figuras 4.11 e 4.12 apresentam-se imagens das raízes de plantas de espinafre jovens e adultas, respetivamente, sujeitas às concentrações de Cd estudadas neste ensaio, ao fim de 21 dias. As raízes de plantas controlo apresentaram-se longas, fasciculadas e com coloração branca e quando expostas a Cd tendem a diminuir de dimensão e a escurecer (Hasanuzzaman *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2013).

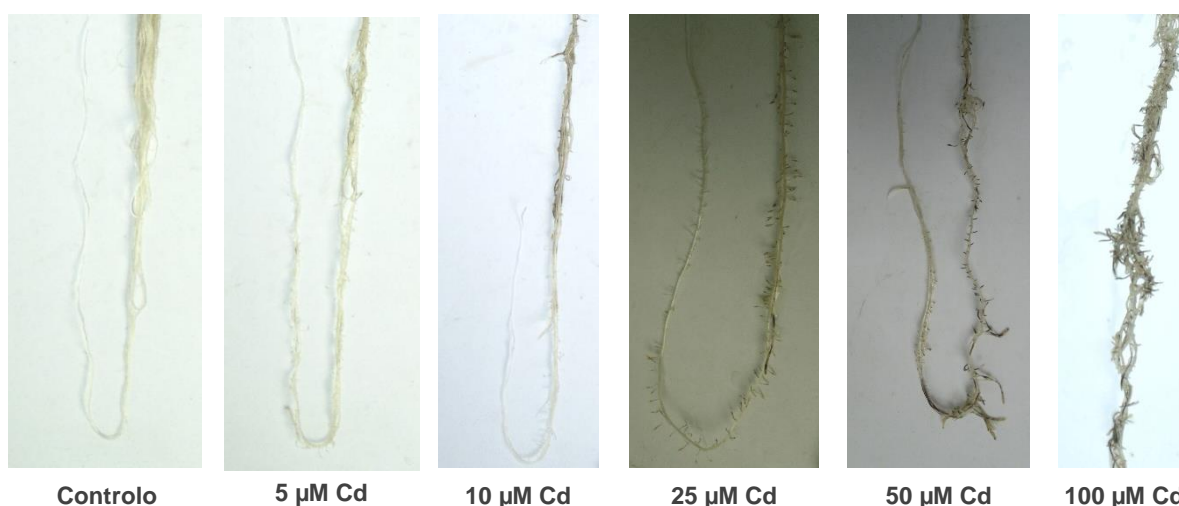


Figura 4.11 - Raízes de plantas jovens expostas a 0 (controlo), 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd durante 21 dias.

Verificou-se que as raízes de plantas jovens sofreram alterações quando expostas a Cd. O Cd tornou as raízes menos fasciculadas, com menor volume radicular face ao controlo. A partir da concentração 10 μM de Cd, as raízes ficam mais escuras, as ramificações mais curtas e de pontas negras.

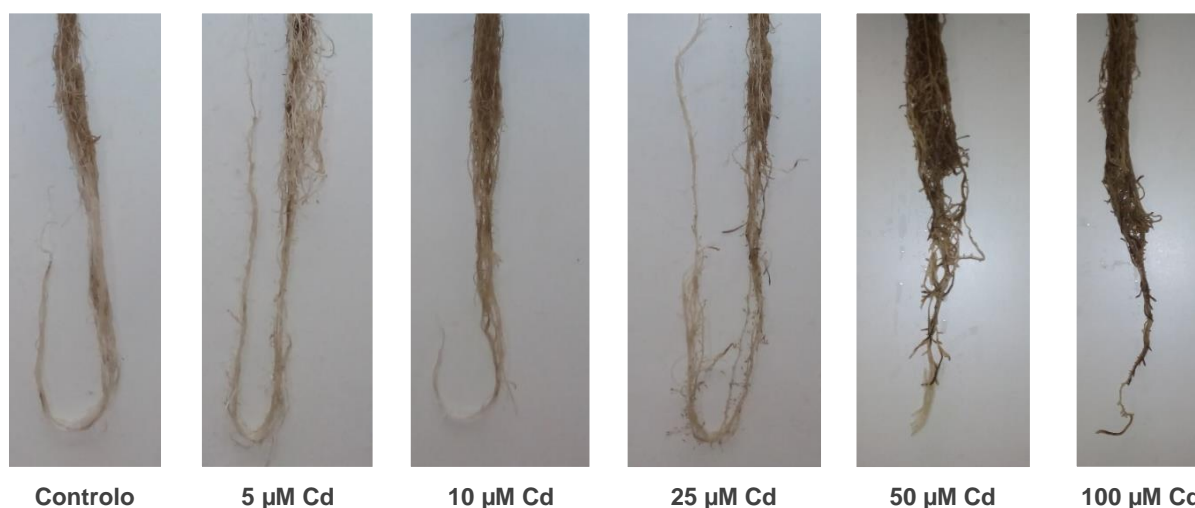


Figura 4.12 - Raízes de plantas adultas expostas a 0 (controlo), 5, 10, 25, 50 e 100 μM de Cd durante 21 dias.

As raízes de plantas adultas também sofreram alterações. Na figura 4.12 é possível verificar que, tal como em plantas jovens, as raízes também escurecem com o aumento da concentração de Cd na solução nutritiva, notando-se para 50 e 100 μM de Cd que as pontas das ramificações também ficaram negras.

A alteração da morfologia da raiz pode estar relacionada com a proliferação anormal das células e o escurecimento deve-se à lenhificação e à atividade de algumas enzimas, como a polifenoloxidase (Clemens, 2006a; Gallego *et al.*, 2012; Hasanuzzaman *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2013).

4.3.3 Correlação entre os resultados obtidos

De modo a verificar como se correlacionam todos estes parâmetros vegetativos com a concentração de Cd a cada tempo, calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson, o qual varia entre -1 e 1, considerando três classes do coeficiente:

Elevada correlação = [-1,00; -0,80] U [0,80; 1,00]; sombreado com coloração cinza-escuro.

Correlação média = [-0,79; -0,50] U [0,50; 0,79]; sombreado com coloração cinza

Baixa correlação = [-0,49; 0,00] U [0,00; 0,49]; sombreado com coloração cinza-clara

Este coeficiente foi calculado em função da concentração de Cd na solução nutritiva e em função do tempo. Neste capítulo serão apresentados os coeficientes considerados como mais relevantes nas tabelas 4.4 em função da concentração de Cd e nas tabelas 4.5 em função do tempo.

Tabela 4.4 - Coeficientes de correlação de Pearson, correlações mais relevantes entre parâmetros vegetativos em função da concentração, para cada dia de ensaio.

	Cd Plantas Jovens					Cd Plantas Adultas				
	Dia 2	Dia 6	Dia 13	Dia 17	Dia 21	Dia 2	Dia 6	Dia 13	Dia 17	Dia 21
Clorofila	0,02	0,64	-0,29	-0,08	-0,12	0,31	-0,61	-0,77	-0,56	-0,93
Comprimento Parte Aérea	0,84	-0,66	-0,83	-0,88	-0,91	0,75	-0,35	-0,63	-0,74	-0,58
Comprimento Raiz	0,10	-0,62	-0,38	-0,64	-0,87	0,56	-0,49	-0,76	-0,86	-0,14
Massa Parte Aérea	0,47	-0,64	-0,67	-0,64	-0,72	0,89	-0,47	-0,54	-0,65	-0,33
Massa Raiz	0,36	-0,26	-0,31	-0,72	-0,91	0,93	-0,49	-0,55	-0,62	-0,48
nº folhas	-0,14	-0,64	0,59	-0,46	-0,80	0,58	0,95	-0,19	-0,45	-0,93

Tabela 4.5 - Coeficientes de correlação de Pearson, correlações mais relevantes entre parâmetros vegetativos em função do tempo, para cada concentração de Cd na solução nutritiva.

[Cd] _{solução nutritiva}	Cd Plantas Jovens					Cd Plantas Adultas				
	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM	100 µM
Clorofila	-0,99	-0,87	-0,86	-0,57	-0,75	-0,47	-0,98	-0,94	-0,83	-0,82
Comprimento Parte Aérea	0,93	0,32	0,67	0,07	-0,62	0,74	0,00	0,18	-0,58	-0,62
Comprimento Raiz	0,99	0,81	0,57	0,52	0,43	0,85	0,59	0,65	-0,76	-0,94
Massa Parte Aérea	0,95	0,39	0,83	0,91	0,92	-0,39	0,02	-0,56	-0,25	-0,57
Massa Raiz	0,95	0,80	0,81	0,89	0,70	0,77	0,67	0,86	0,04	-0,22
nº folhas	0,93	0,89	0,93	0,83	-0,75	0,37	0,79	0,85	-0,83	0,28



Quando se correlacionam as concentrações de Cd nos vários tecidos analisados, seja em função do tempo ou da concentração de Cd na solução nutritiva, esta é sempre elevada e positiva, tal como esperado, pois verificamos pelas curvas de acumulação, que o aumento de Cd a nível radicular reflete-se no aumento de Cd em pecíolos e em folhas.

Em plantas jovens, ao 2º dia de contaminação os parâmetros vegetativos apresentam baixas correlações, com a exceção da Cd_{tecidos} vs. Comprimento da parte aérea, que apresenta elevada correlação positiva. As baixas correlações podem estar relacionadas com o facto das concentrações de Cd nos órgãos não serem suficientemente elevadas para provocar alterações.

Ao 6º dia de ensaio, em plantas jovens, a maioria dos coeficientes de correlação são médios, para folhas, pecíolos e raízes. A clorofila aumenta com o aumento da concentração de Cd na solução nutritiva (considerando Cd em qualquer órgão), demonstrando que ao 6º dia a degradação da clorofila não é evidente, tal como verificado na figura 4.9a e descrito anteriormente. Para os restantes dias de ensaio, esta correlação perde a significância (correlação baixa), tornando este resultado pouco expressivo. A baixa correlação relaciona-se com o facto de a quantidade de clorofila não demonstrar um comportamento linear com a concentração de Cd na solução nutritiva, como se prevê quando se aplica uma correlação de Pearson. Os restantes parâmetros de crescimento, ao dia 6, apresentaram uma correlação média e negativa, com a exceção da massa da raiz que foi baixa e negativa. Correlações negativas demonstram que estes parâmetros foram afetados pela concentração de Cd na planta, pela sua diminuição com o aumento de Cd.

Apesar de, ao 2º dia de ensaio, o comprimento da parte aérea aumentar com o aumento do Cd na solução nutritiva, ao 6º dia esta correlação torna-se negativa (em folhas, pecíolos ou raízes) e de facto pelo gráfico da figura 4.3a verificou-se que a partir do dia 6 surge a primeira diferença significativa entre plantas controlo e contaminadas com 100 μM de Cd. Com o aumento do tempo de exposição as diferenças significativas estendem-se às outras contaminações de Cd na solução nutritiva, refletindo-se em correlações negativas superiores para os restantes dias de ensaio. Deste modo, quanto maior o tempo de exposição, mais expressiva foi esta correlação, tal como se verificou nos dados anteriores, representados na figura 4.3a, confirmados pelo registo fotográfico nas figuras A1 e A2 em anexo e pelo IT da figura 4.7.



Verificou-se o mesmo comportamento para a massa da parte aérea, mas com coeficientes de correlação mais baixos, concordando com os resultados descritos anteriormente, relativos à figura 4.5a.

As correlações entre a concentração de Cd na planta e comprimentos e massas da raiz são também negativos a partir do dia 6, demonstrando que a sua diminuição pode estar relacionada com a presença de Cd na planta, tal como descrito anteriormente. Quanto maior o tempo de exposição maior a correlação descrita, pois maior a concentração de Cd na planta (figuras 4.3b e 4.5b).

Em plantas jovens a concentração de clorofila apresenta correlações baixas ou médias (dia 6), apesar de, pela figura 4.9a e 4.10 se ter confirmado a sua diminuição com o aumento de Cd na solução nutritiva e consequentemente nos órgãos da planta. Contudo o facto de, em plantas contaminadas com 100 μM de Cd, a concentração de clorofila ser superior às de outras contaminações torna este comportamento não linear e por isso não correlacionável pela correlação de Pearson.

Em relação às plantas adultas (tabela 4.6), os comprimentos da parte aérea e da raiz, no 2º dia de colheita, demonstraram aumentar com o aumento do Cd na solução nutritiva e consequentemente, nos tecidos. Este aumento pode refletir-se como um estímulo de Cd para o crescimento. Contudo ao dia 6 a correlação diminui e aos dias 13, 17 e 21 a correlação torna-se média/elevada e negativa, significando que os comprimentos de plantas adultas expostas a Cd são afetados pelo aumento da concentração deste (resultado anteriormente identificado pela figura 4.4, o IT na figura 4.8 e figuras em anexo A3 e A4).

A correlação entre as massas com o aumento de Cd na solução nutritiva, para cada dia, apresenta-se média e negativa a partir do dia 13, representando, tal como descrito nos resultados apresentados, que estes parâmetros em plantas adultas são afetados pela contaminação com Cd, sendo coerente com os resultados da figura 4.5.

A variação da clorofila com a concentração de Cd presente na planta, em função do Cd na solução nutritiva, apresentou uma baixa correlação ao 2º dia de exposição, tornando-se negativa para os restantes dias. Verifica-se assim que a clorofila em plantas adultas é afetada negativamente pela presença de Cd nos tecidos, diminuindo com o aumento de Cd na solução nutritiva. Apesar deste efeito não ter demonstrado significância estatística na figura 4.9b, existe uma correlação média entre estes parâmetros. Esta correlação é superior ao 21º dia de ensaio, com a Cd em folhas, sendo concordante com os resultados descritos anteriormente (figura 4.9b e figuras A3 e A4, em anexo).



O número de folhas, apesar de diminuir com o aumento do Cd na solução nutritiva nos dados anteriormente descritos, apresenta um coeficiente de correlação de Pearson elevado e negativo apenas ao dia 17 e para Cd em pecíolos e em raiz.

Além da variação de cada parâmetro em estudo com a concentração, pretende-se verificar as correlações ao longo do tempo para cada contaminação de Cd, como se apresenta na tabela 4.5 para as plantas jovens e adultas.

Em plantas jovens, para qualquer concentração de Cd em solução nutritiva, a correlação com a clorofila é negativa, demonstrando que existe perda de clorofila ao longo do tempo quando planta é exposta a qualquer concentração de Cd utilizada, tal como verificado anteriormente pelo gráfico da figura 4.9a e pela figura 4.10.

Com a exceção dos comprimentos da parte aérea, em plantas jovens as correlações entre parâmetros de massas e comprimentos e a concentração de Cd, para cada concentração de Cd na solução nutritiva, foram positivas devido ao aumento destes parâmetros ao longo do tempo, como consequência do crescimento normal da planta.

Na tabela 4.5, para plantas adultas, verifica-se que para qualquer concentração de Cd na solução nutritiva, a concentração de clorofila diminui ao longo do tempo, apesar de que essa correlação foi baixa a 5 μM de Cd. Apesar disso, os resultados anteriores demonstram apenas uma perda estatisticamente significativa para concentrações de Cd de 100 μM , evidenciando a tendência para diminuição da clorofila ao longo do tempo, isto é com aumento de Cd na planta.

As correlações dos comprimentos e massas de plantas adultas, ao contrário do verificado para plantas jovens, nem sempre são positivas. Isto não significa que a planta diminua as suas dimensões com o tempo, mas pode ser reflexo da variabilidade e consequentemente do elevado desvio padrão apresentado.

De um modo geral, o parâmetro mais afetado por cada uma das concentrações foi o comprimento das raízes, o qual aumentou com a concentração de Cd na planta e ao longo do tempo, até à aplicação de 25 μM de Cd e diminuiu com a concentração de Cd nos tecidos, em concentrações de Cd superiores a 50 μM . Existe assim, também pela correlação, a evidência de estímulo de crescimento radicular já referida anteriormente na discussão da figura 4.4b.



4.4. Conclusão

Com o ensaio deste capítulo foi possível verificar que as plantas com diferentes estados desenvolvimento apresentam diferentes comportamentos de acumulação e consequentemente diferentes efeitos exteriores.

Independentemente do estado de desenvolvimento da planta, ambas apresentaram elevada capacidade acumuladora podendo-se considerar a planta do espinafre como uma planta hiperacumuladora ($612,72 \pm 31,11$ mg Cd kg⁻¹ MS de folhas de plantas jovens e $179,48 \pm 12,39$ mg Cd kg⁻¹ MS de folhas plantas adultas quando sujeitas a 100 µM de Cd durante 21 dias).

O Cd afetou a generalidade dos parâmetros vegetativos em estudo. Os tempos de exposição mais longos e as concentrações de 100 µM foram as que permitiram verificar maior número de efeitos negativos deste metal. Os comprimentos tanto de plantas jovens como adultas diminuíram com significância aos dias 17 e 21 de ensaio e concentrações de 100 µM, sendo também detetados efeitos de estímulo de crescimento de raiz para concentrações de contaminação mais baixas (5 e 10 µM). As massas quer da parte aérea quer da raiz, também diminuíram relativamente ao controlo, sendo este efeito mais notório em plantas jovens.

Apesar destes parâmetros terem sido afetados pelo Cd, por si só não são suficientes para permitir a um consumidor deste vegetal identificar a existência de um problema de contaminação da planta. Quando a produtividade de uma cultura é afetada por igual, torna-se mais difícil a deteção de falhas de crescimento. A coloração das folhas é assim um dos parâmetros mais utilizados para deteção de qualquer problema com a cultura. A coloração das plantas em estudo também sofreu alterações mas estas foram mais evidentes para dias mais longos de exposição (dias 17 e 21). Em plantas adultas estes efeitos foram observados, apesar de que sem diferenças estatisticamente significativas, apenas para concentrações de 100 µM de Cd e para plantas jovens com diferenças estatisticamente significativas, para concentrações de 5, 10 e 25 µM.

Ao 13º dia de ensaio as plantas de espinafre demonstraram uma elevada capacidade de absorção e acumulação sem demonstrar danos visíveis, podendo constituir um problema para o consumidor. Neste sentido com o objetivo de atingir um conhecimento holístico sobre a capacidade de resistência da planta; além da capacidade acumulativa desta, é importante compreender a capacidade de superar o stresse induzido pelo Cd.

Surge assim a necessidade de estudar a resposta metabólica da planta, identificando os mecanismos que permitem à planta de espinafre suportar as elevadas concentrações de Cd detetadas neste trabalho. No capítulo seguinte foi desenvolvido um ensaio com o objetivo de elucidar alguns pontos importantes do metabolismo do espinafre que participam na resposta ao stresse oxidativo induzido pelo Cd. Foram também utilizadas duas modalidades de crescimento (plantas jovens e plantas adultas), mas apenas duas concentrações de Cd (25 e 50 μM) 14 dias de exposição.

Capítulo V

Ensaio de resposta metabólica ao
efeito tóxico do Cd

Capítulo V – Ensaio de resposta metabólica ao efeito tóxico de Cd

5.1. Introdução

A exposição de plantas ao Cd pode provocar stresse oxidativo que é resultado do aumento da presença de espécies reativas de oxigénio (ROS). Este aumento resulta de alterações que afetam a eficiente remoção de ROS naturalmente formados no metabolismo aeróbio, ou por ocorrer uma produção excessiva destes ROS. Como resposta, as plantas desenvolvem mecanismos de tolerância/defesa de modo a manter a concentração de radicais livres em limites razoáveis, evitando ou minorando os seus efeitos oxidativos nos compartimentos celulares.

O Cd é um metal pesado sem função biológica conhecida e é considerado um dos mais fitotóxicos (DalCorso *et al.*, 2010). É um elemento muito persistente no ambiente, muito solúvel em água o que o torna um elemento muito biodisponível e como tal, facilmente absorvido pelas plantas (DalCorso *et al.*, 2010; Martínez-Peñalver *et al.*, 2012).

O Cd pode ser absorvido pela planta pelos mesmos transportadores que alguns metais essenciais, tais como Ca, Mg, Fe, Zn e Mn (Sánita di Toppi & Gabrielli, 1999; Clemens, 2006a; Gallego *et al.*, 2012; DalCorso *et al.*, 2010), podendo competir com esses elementos afetando a sua concentração nos tecidos vegetais (De La Rosa *et al.*, 2004; De la Rosa *et al.*, 2005; Redondo-Gómez *et al.*, 2009; Lefèvre *et al.*, 2010; Dandan *et al.*, 2012). Choppala *et al.* (2014) refere que o Cd absorvido pelas raízes pode ser acumulado nos vacúolos das próprias células das raízes ou ser transportado para a parte aérea pelo xilema tal como acontece com outros elementos.

De acordo com White & Brown (2010), concentrações de Cd superiores a 5-10 mg kg⁻¹ de matéria seca são tóxicas para a maioria das plantas. A toxicidade do Cd para as plantas é atribuída a diversos fatores tais como: o bloqueio de grupos funcionais de biomoléculas, a inibição da atividade enzimática, a alteração da concentração de elementos essenciais, alterações cromossómicas e do ciclo de divisão celular, o fecho dos estomas, a degradação do sistema vascular e do sistema fotossintético, levando à diminuição da concentração de clorofilas e carotenoides e o enrolamento das folhas (*leaf rolling*) (DalCorso *et al.*, 2010; Mohamed *et al.*, 2012; Ozyigit *et al.*, 2013; Choppala *et al.*, 2014).

Ao nível metabólico, o Cd desencadeia stresse oxidativo e danos oxidativos que afetam a integridade celular por degradação da membrana, de organelos celulares e de biomoléculas (Choppala *et al.*, 2014). Apesar do Cd não causar diretamente o aumento da produção de



ROS, ocorre stresse oxidativo induzido pelo Cd devido ao desequilíbrio entre a produção e remoção de ROS.

O H_2O_2 é um tipo de ROS que é produzido normalmente no metabolismo da planta, em processos como a respiração celular ou a fotossíntese (Apel & Hirt, 2004; Navrot *et al.*, 2007; Gupta, 2011). O H_2O_2 é também responsável pela regulação do crescimento, tendo sido observados elevados níveis deste composto quando a planta atinge um máximo de desenvolvimento (Smirnoff, 2005). No entanto, quando a planta é exposta a uma forma de stresse, abiótico ou biótico, pode existir uma produção excessiva de H_2O_2 , e consequentemente, gerar stresse oxidativo e inibição do crescimento independentemente do estado de desenvolvimento (Smirnoff, 2005).

A produção de H_2O_2 por plantas expostas a metais pesados, como o Cd, tem sido largamente descrita por vários autores (Møller *et al.*, 2007; DalCorso *et al.*, 2008; Mittler *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2013; Mourato *et al.*, 2015). Segundo Navrot *et al.* (2007), as plantas necessitam de controlar os níveis destas moléculas devido à sua natureza prejudicial, mas por outro lado utilizam-nas como moléculas de sinalização, como resposta a vários stresses e/ou ameaças à integridade celular.

Os ROS atuam diretamente sobre os lípidos, causando a sua oxidação. Os ácidos gordos polinsaturados (AGPI) são os mais suscetíveis de sofrer peroxidação, com degradação das membranas, que podem mesmo conduzir a morte celular. A peroxidação de AGPI resulta na formação de aldeídos como por exemplo, o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e malondialdeído (MDA), bem como diversos outros produtos resultantes da alteração de ácidos gordos, tal como é referido por Møller *et al.* (2007). Nas células vegetais, alguns dos produtos da oxidação destes lípidos funcionam, diretamente ou após a alteração enzimática, como mensageiros secundários.

A degradação da clorofila e consequentemente a inibição do processo fotossintético é também uma consequência da exposição ao Cd. No entanto, para a maioria das espécies é necessária uma elevada concentração de Cd para que sejam detetados efeitos no sistema fotossintético (Ekmekci *et al.*, 2008; Redondo-Gómez *et al.*, 2010; Roychoudhury *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013). Tal como referido anteriormente, no Cap.I, a diminuição da concentração de clorofila e a consequente diminuição do processo fotossintético pode estar relacionada com a degradação de clorofilas ou a inibição da sua produção. A degradação da clorofila ocorre devido à substituição de Mg na molécula de clorofila, e de Fe nos citocromos de proteínas

envolvidas na fotossíntese (Taiz & Zeiger, 2002; DalCorso *et al.*, 2008; Marques & Nascimento, 2013).

O Mg é parte estrutural do núcleo tetrapirrólico da molécula de clorofila, mas tem também um papel específico na ativação de enzimas envolvidas na fotossíntese. A carência de Mg provoca cloroses entre as nervuras, verificando-se em primeiro lugar nas folhas mais velhas, devido à mobilidade deste elemento (Taiz & Zeiger, 2002). O Fe tem um papel importante como componente de complexos proteicos (ferredoxinas) envolvidos na transferência de elétrons na fase luminosa da fotossíntese. Em ambos os casos, tanto para a carência de Mg como de Fe, há um sintoma característico que são as cloroses entre nervuras. Em contraste com Mg, as cloroses resultantes de falta de ferro, surgem inicialmente nas folhas mais jovens, porque o ferro não pode ser prontamente mobilizado a partir de folhas mais velhas (Taiz & Zeiger, 2002). DalCorso *et al.* (2008) referem que as cloroses podem surgir de alterações na razão Fe/Zn, bem como por efeitos negativos no metabolismo da clorofila, causados pelo Cd.

O H_2O_2 , o MDA e a clorofila são, neste capítulo, descritos como parâmetros de avaliação da extensão do stresse oxidativo, visto que a alteração da sua concentração intracelular pode ser uma consequência da exposição ao Cd.

Entre as estratégias e mecanismos de defesa das plantas, que permitem lidar com elevadas concentrações de Cd nas células, incluem-se a ativação de mecanismos de sequestro e destoxificação, enzimáticos e não enzimáticos, que possibilitam o controlo dos níveis intracelulares de ROS, e consequentemente o controlo de danos oxidativos que podem levar à morte da planta (Gallego *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013; Choppala *et al.*, 2014).

No processo de resposta antioxidante podem atuar enzimas como catalases e peroxidases (GPOD, APX, GPX) que atuam diretamente sobre o H_2O_2 , mas também outras enzimas, como GR, a monodesidroascorbato-redutase (MDHAR) e a desidrodesidroascorbato-redutase (DHAR), associadas à via metabólica da glutatona-ascorbato, e que são muito importantes na regeneração de sistemas antioxidantes não enzimáticos, como o ascorbato e a glutatona (Mittler, 2002; Martins *et al.*, 2010). Para além destes, outros compostos são referidos como parte integrante do sistema antioxidante não enzimático como a prolina, os carotenoides ou ainda agentes quelantes como compostos peptídicos (metalotioneínas - MT e PC), nicotinamida, aminoácidos e alguns AO, pelo que são importantes nos processos de tolerância dos organismos ao stresse oxidativo (Clemens, 2006b; DalCorso *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2012; Gallego *et al.*, 2012; Mourato *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013).



O ascorbato (AsC) apresenta um papel bem definido em diversos compartimentos celulares como antioxidante e como substrato de enzimas como a APX.

A prolina livre é um aminoácido descrito como um composto participante no mecanismo de defesa antioxidante não enzimático (Martins *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2013a). O aumento da sua concentração em plantas sujeitas a stresse abiótico é descrito por vários autores, seja por exposição a stresse salino ou exposição a metais pesados (Demiral & Turkan, 2005; Huang & Wang, 2010; Fernández *et al.*, 2013a). A prolina desempenha um papel importante na regulação osmótica, proteção de enzimas e estabilização de estruturas sub-celulares (Huang & Wang, 2010; Mourato *et al.*, 2012). Huang & Wang (2010) referem ainda um possível papel na remoção de ROS e no sequestro de iões metálicos.

Os carotenóides são terpenóides que apresentam importantes funções na interação planta-ambiente, mas importa salientar o seu papel na proteção do sistema fotossintético, promovendo a destoxificação de ROS (Jomava & Valko, 2013; Esteban *et al.*, 2015). Os carotenóides são descritos por Esteban *et al.* (2015), como potentes inibidores e sequestradores de ROS, reagindo com estes para formar espécies menos reativas através de diversos mecanismos reacionais (Jomava & Valko 2013), referindo ainda que o β -caroteno atua especificamente sobre o singlete de oxigénio e a neoxantina sobre o anião superóxido.

A resposta antioxidante dos carotenoides pode ocorrer em conjunto com outros compostos da planta. Por exemplo, a zeoxantina previne a foto-oxidação em conjunto com tocoferóis sob condições de elevada luminosidade ou exposição a metais pesados; outro exemplo, são os pigmentos do ciclo de xantofilas (os chamados pigmentos VAZ, de violaxantina + anteraxantina + zeaxantina) que, em conjunto com a SOD conferem proteção ao sistema fotossintético contra danos oxidativos (Esteban *et al.*, 2015).

Os carotenoides, são sintetizados a partir de geranilgeranil-pirofosfato (C₂₀), tal como as clorofilas e tocoferóis, sendo o ponto de partida da via bioquímica de síntese o fitoeno (C₄₀, carotenoide incolor). Na figura 5.1, está presente um esquema simplificado de produção de carotenoides, no qual é possível identificar o ciclo das xantofilas, já descrito, e o ciclo LXL (luteína epóxido – luteína). As estruturas químicas dos principais carotenoides da via estão representadas, na figura 5.1, pela sua cor natural com base no espectro UV/Vis (ultravioleta/visível). As xantofilas que participam na dissipação de energia térmica através dos ciclos de xantofilas ou LXL são representadas dentro dos quadrados tracejados, e o ácido abscísico (ABA) e a lodoxantina surgem como alguns dos produtos da oxidação de carotenoides (adaptado de Esteban *et al.*, 2015).

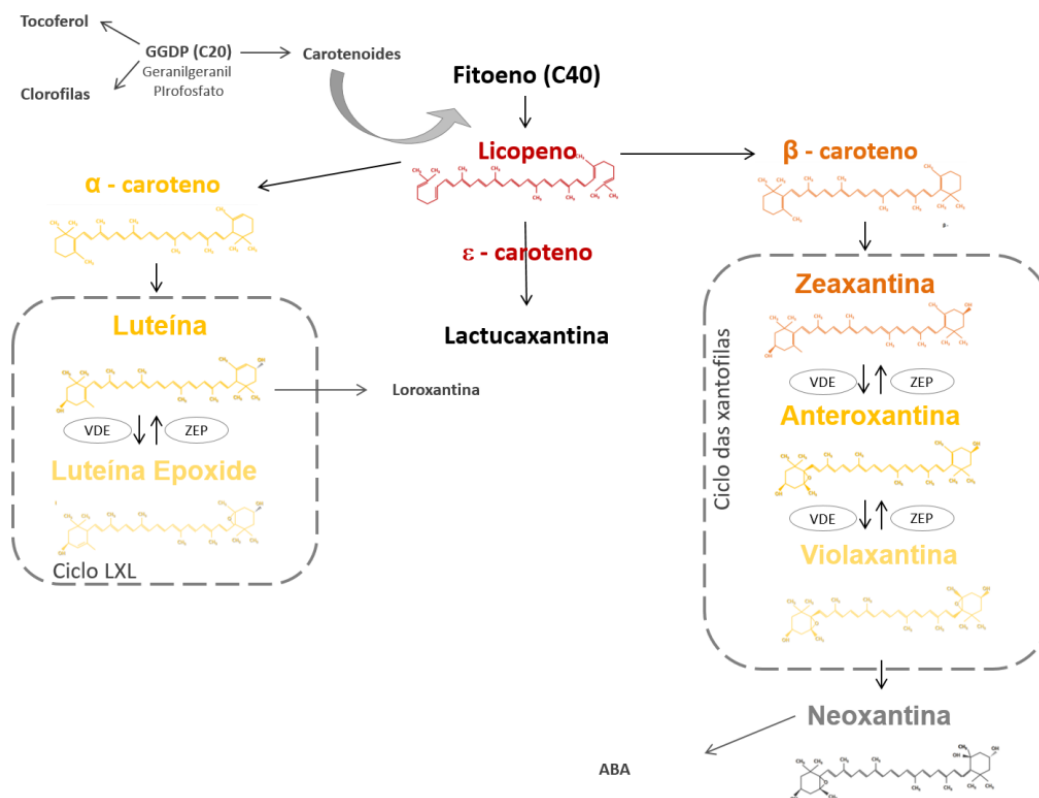


Figura 5.1 - Esquema simplificado da produção de carotenoides. GGDP - geranilgeranil pirofosfato; Ciclo LXL – ciclo luteína epóxido – luteína; Ciclo das xantofilas – ciclo vio-ant-zea VDE - violaxantina-deepoxidase; ZEP - zeaxantina-epoxidase; ABA – ácido abscísico e loroxantina são produtos da oxidação de carotenoides (adaptado de Esteban *et al.*, 2015).

O vacúolo tem nas plantas um papel importante no armazenamento de substâncias tóxicas e de vários contaminantes, podendo ser utilizado para acumular complexos relacionados com o Cd, como uma estratégia de defesa (Arneloti *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2014).

A produção de fitoquelatinas por plantas, quando expostas a Cd, tem sido largamente descrita como uma importante componente dos mecanismos de resposta a esse metal devido à afinidade e estabilidade de complexos PC-Cd (Clemens, 2006b; Wood & Feldmann, 2012; Fernández *et al.*, 2013b; Choppala *et al.*, 2014). A formação de complexos PC-Cd permite o seu transporte e acumulação em vacúolos, limitando a interferência metabólica do Cd e a sua atividade no citosol (Park *et al.*, 2011; Choppala *et al.*, 2014). As PC são péptidos constituídos por Glu – Cys – Gly, quando as PC de estrutura mais simples se tornam insuficientes para formar complexos, formam-se PC_n com crescentes repetições de glutamato-cisteína (Glu – Cys) (Clemens, 2006b; Najmanova *et al.*, 2012; Serrano *et al.*, 2015). O aumento das repetições Glu – Cys, reflete-se no aumento de grupos tiol aos quais o Cd se pode ligar.



A glutationa (GSH) de estrutura Glu - Cys – Gly, é o precursor para a síntese de PC, contudo é também descrita como tendo um papel ativo na destoxificação de ROS, ligando-se ao metal ou como substrato da GPX. Se por um lado, a GSH pode ser oxidada por ROS formados sob stresse induzido por Cd, por outro lado, a síntese de PC necessita de GSH o que pode levar a uma diminuição dos níveis de glutationa (Ammar *et al.*, 2008b; Schutzendubel *et al.*, 2001).

Os ácidos orgânicos (AO), tal como as PC e a GSH têm capacidade de formar complexos estáveis com o Cd, por conseguinte, restringindo a sua toxicidade (Arneloti *et al.*, 2008; Mourato *et al.*, 2012). Os AO podem assim ser utilizados como transportadores de catiões para os vacúolos, tal como as PC. A formação de complexos pode ocorrer tanto na parte aérea como nas raízes, onde os ácidos orgânicos se ligam ao metal e o transportam para a parte aérea e vacúolos.

Uma das principais causas para o aumento ou diminuição de AO nas plantas é a ativação ou a inibição da atividade de enzimas de uma determinada via metabólica. Por exemplo, um aumento de ácido cítrico pode ser causado pela inibição das enzimas no ciclo de Krebs e, consequentemente, ocorre um ajuste na concentração e perfil dos ácidos orgânicos desta via, e pode ocorrer a acidificação do citoplasma. Desta forma, as variações na concentração de AO podem indicar uma regulação das reações do ciclo de Krebs, que pode ser resultante de uma inibição das enzimas envolvidas nas reações de descarboxilação oxidativa e da síntese de ATP, causando um aumento de ácido cítrico.

A atividade antioxidante nas plantas, assegurada pela componente enzimática e não enzimática existente nos diferentes compartimentos celulares, tem sido descrita por vários autores como a principal forma de garantir uma resposta ao stresse oxidativo, através de uma coordenação eficiente na remoção de ROS, na neutralização do seu efeito nocivo, bem como pela capacidade de garantir níveis favoráveis de potencial redutor celular. A resposta antioxidante enzimática é assegurada pela atividade de diversas enzimas:

- a catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e a guaiacol-peroxidase (GPOD, EC 1.11.1.7) que catalisam a transformação de H_2O_2 em água;
- a superóxido-dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) que catalisa a transformação de superóxido $O_2^{\cdot-}$, em H_2O_2 e oxigénio (O_2);
- a ascorbato-peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) e a glutationa-peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) que catalisam a conversão de H_2O_2 em H_2O , à custa da oxidação de ascorbato e de glutationa, respetivamente;

- a glutathiona-redutase (GR, EC 1.8.1.7), responsável pela regeneração da glutathiona reduzida com consumo de NADPH (Mittler, 2002; Martins *et al.*, 2013).

A ação conjugada e coordenada destas enzimas formando os ciclos água-água e a via glutathiona–ascorbato (figura 1.6), permite o funcionamento de um mecanismo de defesa eficaz. A atividade destas enzimas permite o equilíbrio eficaz entre a produção e remoção de ROS (Benavides *et al.*, 2005), mesmo quando existe uma produção excessiva destas espécies. A atividade destas enzimas pode ser alterada pela exposição ao Cd. Embora algumas enzimas possam ser inibidas pelo efeito tóxico do Cd (DalCorso *et al.*, 2010) estas enzimas que fazem parte do mecanismo de resposta metabólica podem por outro lado sofrer ativação, e consequentemente um aumento da atividade enzimática por indução de mecanismos de resposta ao stresse oxidativo.

O efeito fitotóxico de metais pesados pode ser dependente de um enorme conjunto de condições de ensaio, tais como a concentração do metal, o tipo de metal, a espécie da planta, o estado de desenvolvimento da planta, etc., obtendo-se diferentes resultados sobre o mecanismo de resposta antioxidante (Mourato *et al.*, 2015). Num sistema antioxidante de uma planta, mais do que o comportamento individual de cada constituinte, é importante o seu comportamento num todo, pois além de atuarem com um objetivo comum, atuam em alguns casos, numa sequência concertada.

O espinafre tem-se demonstrado uma planta com elevada capacidade de acumulação de Cd, sem demonstrar danos visíveis (Liang *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2016). No estudo de uma planta comestível como o espinafre, em que se verifica uma capacidade de acumulação de metais pesados (Kuboi *et al.*, 1986; Sinha *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2016) é particularmente importante compreender e definir os processos metabólicos responsáveis pela tolerância ao efeito tóxico do cádmio, devido às implicações que pode ter sobre o ambiente e a segurança alimentar.

Com este capítulo pretende-se caracterizar os mecanismos de tolerância que se manifestam ativos na planta espinafre em resposta ao Cd, em diferentes estados de desenvolvimento da planta, jovem e adulta.

5.2. Material e métodos

As plantas de espinafre, com 30 e 70 dias de crescimento após germinação, designadas respetivamente por plantas jovens e adultas, foram submetidas a concentrações de 25 e 50



μM de Cd durante 14 dias, em solução nutritiva, nas condições definidas no ponto 2.1.3. do Cap.II. Estas condições foram definidas com base nos ensaios anteriormente efetuados, em que as plantas evidenciaram acumulação de elevadas concentrações de Cd, sem no entanto demonstrar alterações muito acentuadas nos parâmetros vegetativos.

As plantas foram colhidas aos dias 0, 2, 7 e 14 após contaminação segundo os procedimentos descritos em 2.2.1., e as amostras foram utilizadas para:

- Determinação da concentração de elementos químicos (2.3.1.);
- Determinação de clorofilas e carotenoides (2.3.2.3. e 2.3.2.4);
- Determinação da peroxidação lipídica (2.3.8);
- Determinação de peróxido de hidrogénio (2.3.9.);
- Determinação de ascorbato (2.3.3.);
- Determinação de prolina total (2.3.4.);
- Determinação de fitoquelatinas e GSH (2.3.5.);
- Determinação de ácidos orgânicos (2.3.6.);
- Determinação de atividades enzimáticas (2.3.7.).

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Caracterização da acumulação de Cd

Na figura 5.2 apresentam-se os resultados para as concentrações de Cd em folhas de plantas jovens e adultas, em função do tempo e da concentração de Cd na solução nutritiva. Verificou-se que as folhas de plantas jovens de espinafre acumularam até $313,96 \pm 1,6 \text{ mg de Cd kg}^{-1} \text{ MS}$ durante 14 dias de exposição (figura 5.2a), enquanto que em folhas de plantas adultas, os valores obtidos foram um máximo de $101,15 \pm 3,7 \text{ mg de Cd kg}^{-1} \text{ MS}$ (figura 5.2b), para o mesmo tempo de exposição ao Cd. Este valor é inferior ao valor obtido em plantas jovens, o que pode ser atribuído às menores necessidades nutricionais da planta num estado de desenvolvimento mais avançado, como foi referido no Cap.IV. Comparando a concentração de Cd nas folhas de plantas contaminadas com 25 e com 50 μM , verifica-se uma diferença percentual ao longo dos 4 períodos de tempo em análise, de 0 %, 46 %, 50 % e 41 % em folhas de plantas jovens e de 0 %, 1 %, 4 % e 41 % em folhas de plantas adultas. A menor diferença percentual em folhas de plantas adultas para cada um dos tempos, está de acordo

com o que foi verificado para os teores obtidos no final do ensaio, indicando que o comportamento se manteve em ambos os estados de desenvolvimento da planta.

Este resultado está concordante com o verificado no Cap.IV, onde as diferenças de concentração absorvida/acumulada em folhas, para diferentes níveis de contaminação (figura 4.1 e 4.2) foi menor em plantas adultas e com menor correlação com a concentração de Cd exposto, em relação às plantas jovens.

A observação dos gráficos da figura 5.2 mostra um comportamento diferente das folhas de plantas jovens (a) e das folhas de plantas adultas (b) no que diz respeito à acumulação do Cd em função do tempo, designadamente na comparação entre os dois níveis de concentração de Cd utilizados. Em folhas jovens há uma diferença muito evidente nos valores acumulados para as diferentes quantidades de Cd na solução nutritiva, enquanto que em plantas adultas só ao fim de 14 dias há diferenças significativas entre as concentrações de 25 e 50 μM de Cd na solução nutritiva.

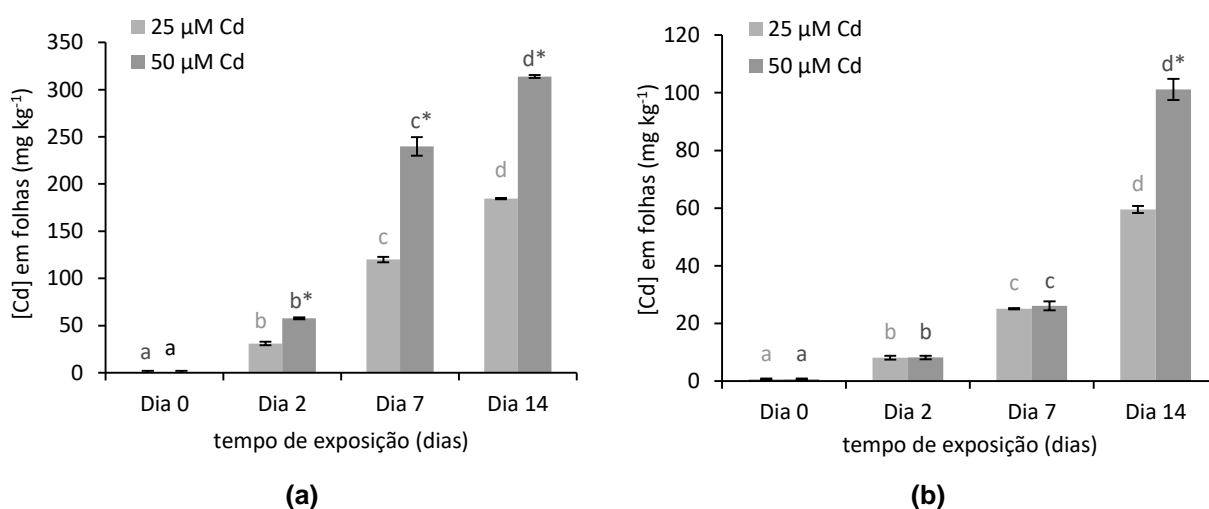


Figura 5.2 - Concentração de Cd em folhas de plantas de espinafre jovens (a) e adultas (b) ao longo de 14 dias de exposição a concentrações de 25 e 50 μM de Cd.

As barras de erro representam o desvio padrão, o asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre 25 e 50 μM de Cd, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada contaminação ($n = 3$).

Em pecíolos (figura 5.3), a diferença percentual dos teores de Cd acumulados, em plantas jovens e adultas, entre cada nível de contaminação, não é tão evidente. Os valores obtidos em plantas jovens, para os 4 dias em análise, foram 0 %, 48 %, 47 % e 49 %, enquanto que



em plantas adultas foram 0 %, 47 %, 37 % e 34 %. Nesta fase de desenvolvimento da planta, dado que ainda não está completamente formado o caule, os pecíolos terão funções de transporte de nutrientes. Pelos resultados obtidos verificámos que a acumulação de Cd em pecíolos é superior em plantas jovens, tal como se verificou em folhas.

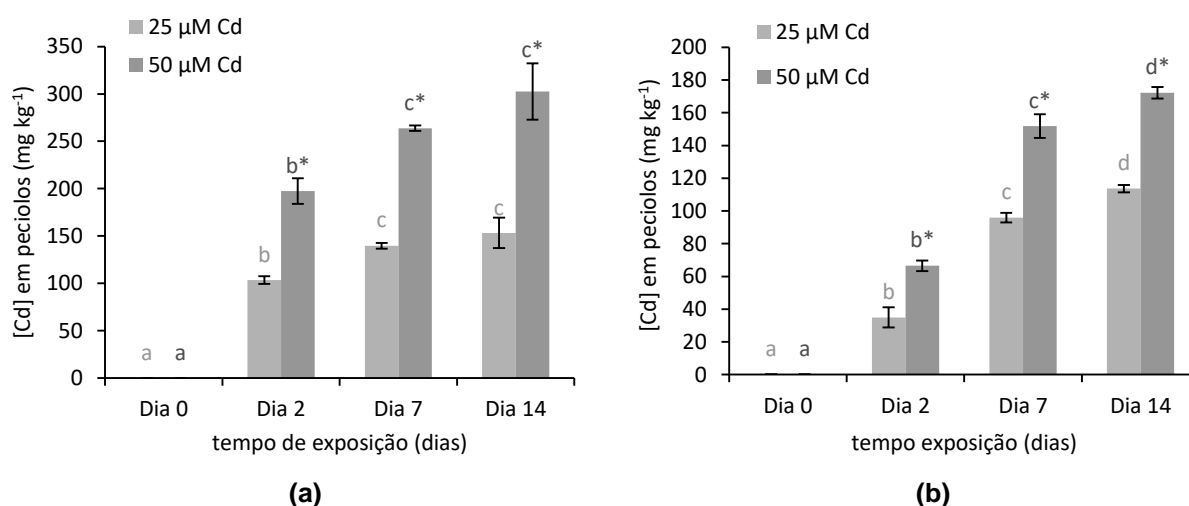


Figura 5.3 - Concentração de Cd em pecíolos de plantas de espinafre jovens (a) e adultas (b) ao longo de 14 dias de exposição a concentrações de 25 e 50 µM de Cd.

As barras de erro representam o desvio padrão, o asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre 25 e 50 µM de Cd, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada contaminação ($n = 3$).

Neste ensaio também se verificou uma concentração de Cd na raiz (figura 5.4) superior à obtida nas outras partes da planta, folhas e pecíolos, tal como já foi discutido em capítulos anteriores. Isto pode ser explicado por ser a raiz o primeiro órgão em contacto com o contaminante, mas também pode indicar a existência de mecanismos de defesa da planta e uma restrição da translocação para a parte aérea da planta. Outros autores têm referido que este facto pode estar relacionado com a retenção de Cd na raiz, quer por ligação às paredes celulares, quer por ligação a quelatos e armazenamento nos vacúolos das raízes (Hasanuzzaman *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2013).

A capacidade de acumulação de Cd na raiz não demonstrou variar entre estados de desenvolvimento da planta, apesar da absorção inicial (entre dia 0 e 2) ser aproximadamente o dobro em plantas adultas. Ao 14º dia, na raiz de plantas jovens expostas a 50 µM Cd, foi obtido um valor de $1519,5 \pm 153,5$ mg de Cd kg⁻¹ MS; para o mesmo tempo, mas na raiz de plantas adultas foi obtido um valor de $1500,4 \pm 63,1$ mg de Cd kg⁻¹ MS. Para o mesmo tempo



de exposição, em plantas expostas a 25 μM Cd, os valores apresentados de Cd na raiz de plantas jovens foram $944,5 \pm 33,8$ mg de Cd kg^{-1} MS e em raízes de plantas adultas foi $813,5 \pm 22,4$ mg de Cd kg^{-1} MS.

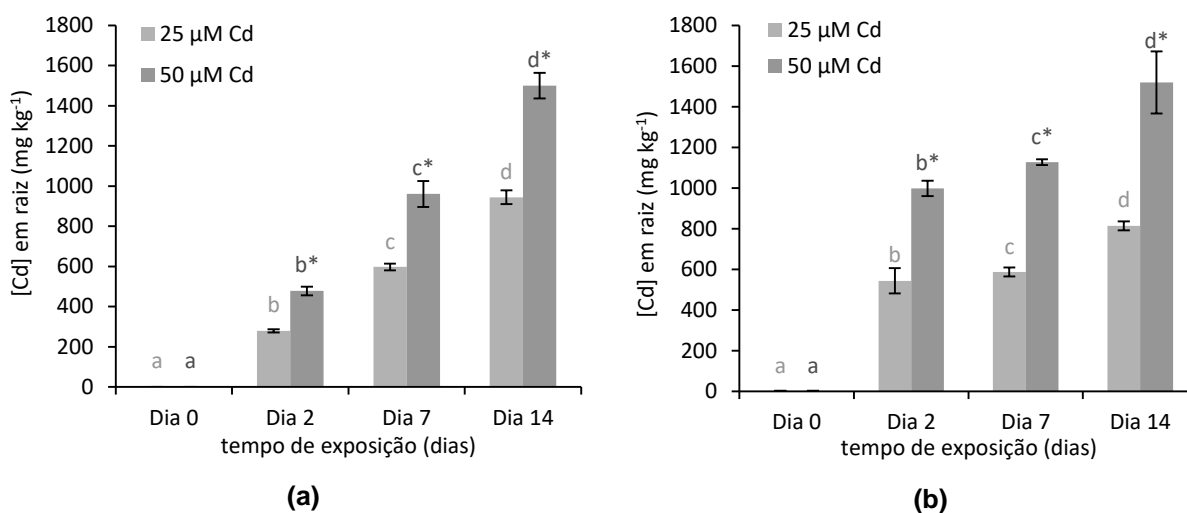


Figura 5.4 - Concentração de Cd em raiz de plantas de espinafre jovens (A) e adultas (B) ao longo de 14 dias de exposição a concentrações de 25 e 50 μM de Cd.

As barras de erro representam o desvio padrão, o asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre 25 e 50 μM de Cd, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada contaminação ($n = 3$).

A semelhança entre as concentrações de Cd nas raízes de plantas para os diferentes estados de desenvolvimento (plantas jovens e adultas) contrasta com o que se verificou em folhas e pecíolos. Uma possível explicação para estes resultados, pode estar relacionada com a maior taxa de crescimento e maiores necessidades nutricionais das plantas jovens, e consequentemente uma maior translocação de nutrientes para a parte aérea destas plantas, embora ao nível radicular esse efeito não seja visível. Dado que a entrada de Cd nas plantas recorre aos mesmos transportadores de alguns elementos essenciais, este comportamento pode indicar uma dificuldade por parte da planta em distinguir os contaminantes dos nutrientes, bem como a sua maior translocação para folhas e pecíolos em fases de desenvolvimento mais intenso.



5.3.2. Caracterização da concentração em elementos minerais

A absorção de outros elementos, incluindo alguns macronutrientes e micronutrientes, também pode ser afetada na presença de Cd (De la Rosa *et al.*, 2004; De la Rosa *et al.*, 2005; Lefèvre *et al.*, 2010; Redondo-Gómez *et al.*, 2010; Dandan *et al.*, 2011), o que pode ser explicado pela competição entre elementos quimicamente semelhantes ou pelo desequilíbrio osmótico que provocam. Nas tabelas 5.1, 5.2 e 5.3 são apresentadas as concentrações de Ca, Mg, K, Cu, Fe, Zn e Mn em folhas, pecíolos e raízes respectivamente, para os diferentes níveis de contaminação testados. Para facilitar a análise dos resultados, na tabela 5.4 apresenta-se um resumo das principais tendências observadas da variação dos teores dos elementos com o Cd em solução nutritiva.

Foram ainda estabelecidas as correlações entre as concentrações de cada elemento com a concentração do Cd nas diferentes partes da planta (tabela 5.5), através do cálculo do coeficiente de correlação de *Pearson*, o qual varia entre -1 e 1. Para esta análise foram consideradas três classes deste coeficiente de correlação de *Pearson*:

Elevada correlação = [-1,00; -0,80] U [0,80; 1,00]; sombreado com coloração cinza-escura.

Correlação média = [-0,79; -0,50] U [0,50; 0,79]; sombreado com coloração cinza.

Baixa correlação = [-0,49; 0,00] U [0,00; 0,49]; sombreado com coloração cinza-clara.

A concentração de Ca em folhas foi em média 43 % superior em plantas adultas. Para tempos de exposição mais longos (7 e 14 dias) a concentração de Ca em plantas adultas, foi afetada negativamente pela presença de Cd, apresentando diferenças estatisticamente significativas ao 14º dia de exposição. Em plantas jovens a concentração de Ca aumentou significativamente na presença de Cd. Em pecíolos a concentração de Ca não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre plantas contaminadas e controle, para qualquer um dos estados de desenvolvimento. O Ca apresenta correlações médias a elevadas, positivas em folhas, o aumento de Ca ocorre em simultâneo com aumento de Cd nas folhas. Para pecíolos e raízes as correlações foram baixas.

As plantas adultas apresentaram uma concentração de Ca em raiz superior à das plantas jovens (≈ 24 %). A concentração de Ca em raiz de plantas adultas, apenas foi estatisticamente inferior ao controle ao 14º dia de exposição a 25 μ M de Cd. Em plantas jovens, verificou-se um aumento da concentração deste elemento em plantas expostas a 50 μ M de Cd, sugerindo um estímulo de absorção por parte da raiz na presença de Cd.

A concentração de Cd demonstrou afetar a concentração de Ca nos tecidos, de modo diferente consoante o estado de desenvolvimento da planta. Alguns autores têm descrito a influência positiva de Cd na acumulação de Ca (De la Rosa *et al.*, 2005; Ghnaya *et al.*, 2005; Mohamed *et al.*, 2012), enquanto outros têm descrito uma diminuição da concentração de Ca na presença de Cd (De la Rosa *et al.*, 2005; Lefèvre *et al.*, 2010; Marques & Nascimento, 2013) ou a inexistência de diferenças estatisticamente significativas (Redondo-Gómez *et al.*, 2010).

De la Rosa *et al.* (2005) verificaram em *Salsola kali* um aumento da concentração de Ca quando aplicadas concentrações inferiores a 45 μM Cd, mas De la Rosa *et al.* (2004), verificaram na mesma espécie a diminuição de Ca quando aplicadas concentrações de 178 μM Cd, podendo este comportamento estar relacionado com a competição de Ca e Cd pelos mesmos transportadores.

DalCorso *et al.* (2008) referem que um aumento da concentração de Ca^{2+} no citosol das células guarda está relacionado com o fecho dos estomas provocado pela produção de ácido acetilsalicílico, podendo ser este o efeito que se observou no presente trabalho em plantas de espinafre, principalmente jovens. Os resultados obtidos para o Ca confirmam que, entre outras variáveis, a idade da planta quando o stresse é aplicado é fundamental para definir o tipo de efeito observado, como tem sido referido por diversos autores (Mourato *et al.*, 2015).

A concentração de Mg foi em média 34 % superior em folhas adultas. A concentração deste elemento diminui significativamente na presença de Cd aos dias 2, 7 e 14 de exposição, em plantas jovens, aumentando ao longo do tempo em plantas controlo e expostas a 25 μM Cd. Em plantas adultas, apenas se verifica a diminuição significativa da concentração de Mg na presença de 50 μM Cd e ao fim de 14 dias de exposição. Em folhas contaminadas com 25 μM de Cd, o Mg mantém o mesmo padrão de Ca. Contudo em folhas expostas a 50 μM de Cd, apesar de com baixas correlações verifica-se que progridem inversamente ao longo do tempo.

Em pecíolos, a concentração de Mg permanece superior em plantas adultas ($\approx 19\%$), e o comportamento é semelhante ao verificado para folhas.

Em raízes, a concentração de Mg é em média 23 % superior em plantas adultas. Nestas plantas, a aplicação de Cd demonstrou afetar negativamente a concentração deste elemento, diminuindo significativamente em plantas contaminadas, ao 14º dia de exposição. O efeito negativo do Cd sobre Mg é mais evidente pelas correlações, que se apresentam elevadas e negativas. Nas raízes das plantas jovens não houve diferenças significativas nos teores deste elemento para as plantas contaminadas com Cd.

**Tabela 5.1** – Concentração de elementos químicos Ca, Mg, K (g kg^{-1} MS) e Fe, Zn, Cu, Mn (mg kg^{-1} MS) em folhas de plantas de espinafre expostas a 0 (controle), 25 μM Cd e 50 μM Cd, durante 14 dias.

O símbolo \pm representa o desvio padrão. O asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle e as plantas contaminadas, para cada dia e diferentes letras minúsculas representam diferença significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada contaminação ($n = 3$). O sombreado verde representa um aumento significativo e o sombreado laranja representa uma diminuição significativa, face ao controle.

Folhas de planta jovem – Controle					Folhas de planta jovem – 25 μM Cd					Folhas de planta jovem – 50 μM Cd				
Dias					Dias					Dias				
0	2	7	14		0	2	7	14		0	2	7	14	
Ca	2,7 \pm 0,1 a	3,1 \pm 0,1 b	3,0 \pm 0,1 b	3,7 \pm 0,0 c	2,7 \pm 0,1 a	3,7 \pm 0,1 b*	3,1 \pm 0,1 c	4,1 \pm 0,1 d*		2,7 \pm 0,1 a	3,5 \pm 0,1 b*	3,9 \pm 0,1 c*	4,8 \pm 0,1 d*	
Mg	8,6 \pm 0,4 a	10,1 \pm 0,5 b	10,9 \pm 0,4 bc	12,2 \pm 0,7 c	8,6 \pm 0,4 a*	8,5 \pm 0,8 a*	9,8 \pm 0,6 ab	10,9 \pm 0,4 b*		8,6 \pm 0,4 a	8,5 \pm 0,4 ab*	7,0 \pm 0,7 b*	8,6 \pm 0,8 a*	
K	166,6 \pm 7,6 a	134,0 \pm 3,3 b	123,4 \pm 8,1 b	138,1 \pm 9,4 b	166,6 \pm 7,6 a	139,5 \pm 8,7 ab	121,1 \pm 17,2 b	124,9 \pm 12,4 b		166,6 \pm 7,6 a	117,6 \pm 10,7 b	123,6 \pm 4,4 bc	158,9 \pm 14,8 ac	
Fe	453,5 \pm 20,3 a	488,3 \pm 19,9 a	390,3 \pm 31,8 b	381,4 \pm 17,5 b	453,5 \pm 20,3 a	481,5 \pm 9,8 a	331,1 \pm 11,4 b	278,2 \pm 10,2 c*		453,5 \pm 20,3 a	463,8 \pm 37,0 a	357,7 \pm 23,3 b	316,9 \pm 7,9 b*	
Zn	451,2 \pm 28,7 a	461,6 \pm 10,9 a	472,5 \pm 7,0 a	478,6 \pm 9,3 a	451,2 \pm 28,7 a	455,9 \pm 9,8 a	380,4 \pm 9,0 b*	331,2 \pm 12,2 c*		451,2 \pm 28,7 a	393,0 \pm 2,3 b*	358,4 \pm 5,6 b*	314,7 \pm 6,3 c*	
Cu	22,3 \pm 1,9 a	18,9 \pm 1,1 ab	16,9 \pm 1,4 bc	14,8 \pm 1,4 c	22,3 \pm 1,9 a	17,5 \pm 1,8 b	15,5 \pm 1,2 c	13,4 \pm 0,4 b		22,3 \pm 1,9 a	16,6 \pm 1,5 b	12,3 \pm 1,0 c*	11,2 \pm 1,0 c*	
Mn	35,1 \pm 6,2 a	39,4 \pm 7,9 b	129,8 \pm 7,1 c	252,7 \pm 11,7 d	35,1 \pm 6,2 a	19,9 \pm 2,3 b*	95,2 \pm 4,3 c*	156,7 \pm 4,8 d*		35,1 \pm 6,2 a	29,7 \pm 4,7 b	119,9 \pm 10,4 c	186,3 \pm 14,4 d*	
Folhas de planta adulta – Controle					Folhas de planta adulta – 25 μM Cd					Folhas de planta adulta – 50 μM Cd				
Dias					Dias					Dias				
0	2	7	14		0	2	7	14		0	2	7	14	
Ca	5,4 \pm 0,0 a	5,3 \pm 0,2 a	6,4 \pm 0,4 b	7,6 \pm 0,5 c	5,4 \pm 0,0 a	5,2 \pm 0,5 a	6,6 \pm 0,5 b	7,2 \pm 0,2 b		5,4 \pm 0,0 a	6,2 \pm 0,4 b*	6,0 \pm 0,2 ab	6,3 \pm 0,2 b*	
Mg	13,4 \pm 0,8 a	13,6 \pm 0,6 a	15,0 \pm 1,1 a	15,3 \pm 1,3 a	13,4 \pm 0,8 a	14,1 \pm 0,7 a	15,4 \pm 1,5 a	15,2 \pm 0,4 a		13,4 \pm 0,8 a	14,6 \pm 0,6 ab	15,3 \pm 0,8 b	12,7 \pm 0,5 a*	
K	74,8 \pm 0,6 ab	67,8 \pm 3,9 a	87,1 \pm 8,1 b	64,5 \pm 3,9 ab	74,0 \pm 7,6 ab	81,4 \pm 4,8 a	61,7 \pm 5,6 b			74,8 \pm 0,6 a	76,0 \pm 2,0 ab*	86,6 \pm 6,9 b	60,0 \pm 4,6 c	
Fe	95,9 \pm 6,2 a	105,2 \pm 9,4 a	99,6 \pm 3,9 a	90,3 \pm 3,0 a	95,9 \pm 6,2 a	92,7 \pm 8,9 a	94,7 \pm 0,5 a	106,3 \pm 3,6 a*		95,9 \pm 6,2 a	99,3 \pm 2,4 a	88,4 \pm 7,1 a	98,3 \pm 5,7 a	
Zn	348,6 \pm 18,7 a	326,9 \pm 16,3 a	355,8 \pm 6,7 a	323,0 \pm 6,6 a	348,6 \pm 18,7 a	340,5 \pm 15,7 a	336,9 \pm 6,4 a*	295,5 \pm 5,1 b*		348,6 \pm 18,7 a	339,2 \pm 11,9 a	314,9 \pm 9,5 ab*	283,7 \pm 12,2 b*	
Cu	13,6 \pm 1,1 ab	14,6 \pm 0,6 a	13,1 \pm 0,8 ab	12,4 \pm 0,6 b	13,6 \pm 1,1 a	14,5 \pm 0,8 a	12,8 \pm 0,5 a	12,5 \pm 0,3 a		13,6 \pm 1,1 a	12,4 \pm 0,9 ab	11,6 \pm 0,5 b	11,3 \pm 0,1 b	
Mn	313,2 \pm 6,8 a	347,3 \pm 22,7 b	362,7 \pm 12,8 bc	397,2 \pm 1,9 c	313,2 \pm 6,8 a	251,0 \pm 28,6 b*	367,5 \pm 9,9 c	374,4 \pm 6,8 c*		313,2 \pm 6,8 a	268,0 \pm 42,6 a*	325,5 \pm 6,9 a*	431,2 \pm 16,7 b	



Tabela 5.2 – Concentração de elementos químicos Ca, Mg, K (g kg⁻¹ MS) e Fe, Zn, Cu, Mn (mg kg⁻¹ MS) em pecíolos de plantas de espinafre expostas a 0 (controle), 25 µM Cd e 50 µM Cd durante 14 dias.

O símbolo ± representa o desvio padrão. O asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle e as plantas contaminadas, para cada dia e diferentes letras minúsculas representam diferença significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada contaminação ($n = 3$). O sombreado verde representa um aumento significativo e o sombreado laranja representa uma diminuição significativa, face ao controle.

Pecíolos de planta jovem – Controle					Pecíolos de planta jovem – 25 µM Cd					Pecíolos de planta jovem – 50 µM Cd				
Dias					Dias					Dias				
0	2	7	14		0	2	7	14		0	2	7	14	
Ca	4,1 ± 0,4 a	4,2 ± 0,5 a	4,5 ± 0,3 a	4,6 ± 0,4 a	4,1 ± 0,4 a	4,8 ± 0,5 a	4,7 ± 0,3 a	4,1 ± 0,1 a		4,1 ± 0,4 a	4,9 ± 0,7 a	4,8 ± 0,7 a	4,4 ± 0,6 a	
Mg	3,1 ± 0,2 a	2,9 ± 0,2 a	3,2 ± 0,0 a	3,8 ± 0,1 b	3,1 ± 0,2 ab	2,7 ± 0,2 a	2,8 ± 0,2 a*	3,4 ± 0,2 b*		3,1 ± 0,2 a	3,0 ± 0,2 a	2,9 ± 0,3 a	3,1 ± 0,1 a*	
K	284,6 ± 53,8 a	243,9 ± 62,3 a	226,0 ± 27,4 a	186,9 ± 11,9 a	284,6 ± 53,8 a	207,2 ± 17,8 ab	170,1 ± 2,6 b*	154,6 ± 15,7 b*		284,6 ± 53,8 a	199,5 ± 21,6 b	161,9 ± 21,7 b	134,7 ± 11,7 b*	
Fe	728,6 ± 53,5 ac	1091,2 ± 74,4 b	867,2 ± 48,3 a	713,1 ± 38,6 c	728,6 ± 53,5 a	1198,9 ± 51,1 b	567,7 ± 59,3 c*	550,7 ± 56,8 c*		728,6 ± 53,5 a	1178,5 ± 82,8 b	667,0 ± 76,4 a*	580,8 ± 32,4 a*	
Zn	403,7 ± 14,6 a	371,9 ± 4,0 b	374,9 ± 2,2 b	376,3 ± 6,8 b	403,7 ± 14,6 a	377,5 ± 14,4 a	304,1 ± 17,5 b*	296,2 ± 8,6 b*		403,7 ± 14,6 a	352,0 ± 24,6 b	285,8 ± 18,0 c*	291,4 ± 9,0 c*	
Cu	25,7 ± 1,5 a	23,3 ± 0,6 a	24,6 ± 1,1 a	7,0 ± 0,6 b	25,7 ± 1,5 a	25,3 ± 1,1 a	21,6 ± 1,6 b	6,5 ± 1,5 c		25,7 ± 1,5 a	23,9 ± 1,2 a	18,8 ± 1,6 b*	7,4 ± 1,4 c	
Mn	47,4 ± 10,5 a	136,2 ± 4,7 b	180,5 ± 1,1 c	121,4 ± 8,8 b	47,4 ± 10,5 a	108,1 ± 11,8 bc*	127,2 ± 15,5 b*	81,4 ± 5,5 c*		47,4 ± 10,5 a	128,5 ± 18,9 bc	133,1 ± 17,9 b*	95,0 ± 4,0 c*	
Pecíolos de planta adulta – Controle					Pecíolos de planta adulta - 25 µM Cd					Pecíolos de planta adulta – 50 µM Cd				
Dias					Dias					Dias				
0	2	7	14		0	2	7	14		0	2	7	14	
Ca	2,2 ± 0,1 a	2,5 ± 0,2 a	2,8 ± 0,1 b	2,5 ± 0,2 ab	2,2 ± 0,1 a	2,6 ± 0,2 b	2,9 ± 0,1 b	2,3 ± 0,1 a		2,1 ± 0,1 a	2,0 ± 0,1 a	2,1 ± 0,1 a	2,5 ± 0,1 b	
Mg	3,7 ± 0,4 ab	3,4 ± 0,3 a	3,7 ± 0,3 ab	4,3 ± 0,0 b	3,7 ± 0,4 a	3,8 ± 0,5 a	4,1 ± 0,4 a	4,0 ± 0,2 a		3,7 ± 0,4 a	3,4 ± 0,2 a	3,4 ± 0,1 a	4,6 ± 0,2 b	
K	77,0 ± 6,7 a	99,3 ± 7,0 b	74,7 ± 3,7 a	54,7 ± 10,4 c	77,0 ± 6,7 a	89,7 ± 5,3 a	91,5 ± 6,0 a*	86,3 ± 6,3 a*		77,0 ± 6,7 a	90,6 ± 7,1 ab	104,3 ± 9,6 b*	99,1 ± 9,2 b*	
Fe	125,9 ± 8,3 a	145,6 ± 2,1 a	149,8 ± 10,5 a	151,2 ± 13,9 a	125,9 ± 8,3 ac	156,8 ± 11,2 ab	158,3 ± 13,9 b	114,6 ± 13,4 c*		125,9 ± 8,3 a	138,9 ± 6,2 a	96,4 ± 9,0 b*	132,6 ± 6,3 a	
Zn	246,8 ± 6,9 a	307,5 ± 24,4 b	322,3 ± 4,0 b	260,8 ± 13,4 a	246,8 ± 6,9 a	328,4 ± 3,6 b	299,1 ± 13,7 bc*	280,6 ± 18,2 c		246,8 ± 6,9 a	267,9 ± 4,5 a	253,8 ± 8,7 a*	264,0 ± 13,7 a	
Cu	8,2 ± 0,7 a	9,2 ± 0,5 a	8,6 ± 0,9 a	8,4 ± 0,7 a	8,2 ± 0,7 a	8,5 ± 0,9 a	9,0 ± 0,9 a	8,5 ± 0,7 a		8,2 ± 0,7 a	7,6 ± 0,5 a*	7,8 ± 0,5 a	8,3 ± 0,7 a	
Mn	101,7 ± 1,0 a	107,2 ± 3,5 a	84,1 ± 3,2 b	101,4 ± 3,8 a	101,7 ± 1,0 a	88,4 ± 1,7 b*	75,1 ± 3,3 c*	65,9 ± 2,5 d*		101,7 ± 1,0 a	76,3 ± 2,2 b*	64,4 ± 1,1 c*	75,4 ± 1,5 b*	

**Tabela 5.3 – Concentração de elementos químicos Ca, Mg, K, Fe, Zn, (g kg⁻¹ MS) e Cu, Mn (mg kg⁻¹ MS) em raiz de plantas de espinafre expostas a 0 (controle), 25 µM Cd e 50 µM Cd durante 14 dias.**

O símbolo ± representa o desvio padrão. O asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle e as plantas contaminadas, para cada dia e diferentes letras minúsculas representam diferença significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada contaminação ($n = 3$). O sombreado verde representa um aumento significativo e o sombreado laranja representa uma diminuição significativa, face ao controle.

Raiz de espinafre jovem – Controle					Raiz espinafre jovem - 25 µM Cd					Raiz espinafre jovem – 50 µM Cd				
Dias					Dias					Dias				
0	2	7	14		0	2	7	14		0	2	7	14	
Ca 2,6±0,2 a	2,8±0,1 a	2,6±0,3 a	2,5±0,2 a		2,6±0,2 ab	2,9±0,1 a	2,5±0,1 b	2,5±0,1 b		2,6±0,2 a	3,4±0,1 b	3,3±0,2 bc*	2,9±0,1 ac*	
Mg 5,9±0,2 a	5,6±0,1 ab	4,4±0,4 c	4860,3±542,8 bc		5,9±0,2 a	5,6±0,4 a	4,3±0,2 b	5,3±0,3 a		5,9±0,2 a	5,4±0,4 a	4,6±0,4 b	5,6±0,3 a	
K 34,1±0,9 ab	43,2±4,4 a	31,5±4,6 b	40,7±2,6 ab		34,1±0,9 a	27,3±2,0 ab	21,2±2,5 b*	30,8±1,5 a*		34,1±0,9 a	27,2±3,3 a	30,5±4,2	28,9±1,9 a*	
Fe 7,5±0,6 a	7,4±0,6 a	8,2±0,5 a	8,3±0,3 a		7,5±0,6 a	7,6±0,1 a	6,2±0,5 b*	7,9±0,3 a		7,5±0,6 ab	7,8±0,1 a	6,6±0,5 b*	8,3±0,3 a	
Zn 1,6±0,1 a	1,4±0,1 ab	1,3±0,1 b	1,3±0,1 b		1,6±0,1 a	1,3±0,1 b	0,6±0,1 c*	0,8±0,0 c*		1,6±0,1 a	1,1±0,1 b*	0,7±0,1 c*	0,8±0,0 c*	
Cu 61,9±1,6 ab	67,5±4,4 a	55,0±2,0 b	31,8±3,5 c		61,9±1,6 ab	71,7±7,5 a	57,1±4,8 b	39,7±1,4 c*		61,9±1,6 ab	71,3±4,8 a	56,4±5,5 b	43,9±0,7 c*	
Mn 84,0±7,4 a	311,8±21,2 b	489,9±28,0 c	356,5±6,2 b		84,0±7,4 a	107,1±24,3 ac*	157,7±10,1 b*	125,0±6,8 bc*		84,0±7,4 a	114,5±8,7 b*	160,1±10,0 c*	129,5±4,4 b*	
Raiz de planta adulta – Controle					Raiz planta adulta - 25 µM Cd					Raiz planta adulta – 50 µM Cd				
Dias					Dias					Dias				
0	2	7	14		0	2	7	14		0	2	7	14	
Ca 3,5±0,1 ab	3,7±0,1 a	3,2±0,2 b	4,7±0,1 c		3,5±0,1 a	3,7±0,2 a	3,4±0,1 a	4,4±0,1 b*		3,5±0,1 a	3,4±0,2 a	3,1±0,1 a	4,5±0,2 b	
Mg 8,2±0,9 a	8,1±0,7 a	6,3±0,5 b	7,1±0,0 ab		8,2±0,9 a	7,6±0,6 a	7,0±0,5 a	5,3±0,3 b*		8,2±0,9 a	7,1±0,6 a	7,0±0,6 a	4,6±0,7 b*	
K 99,3±8,7 a	95,8±9,7 a	72,2±7,0 b	51,3±1,4 c		99,3±8,7 a	89,1±7,4 a	63,1±4,3 b	46,9±6,2 c		99,3±8,7 a	80,3±2,5 b	51,3±6,8 c*	35,4±3,0 d*	
Fe 7,8±0,6 a	8,6±0,8 a	7,7±0,4 a	8,3±0,5 a		7,8±0,6 ab	9,1±0,5 a	7,6±0,3 b	7,6±0,4 b		7,8±0,6 a	8,1±0,4 a	8,3±0,6 a	7,8±0,6 a	
Zn 1,1±0,1 a	1,2±0,1 a	1,1±0,1 a	1,2±0,0 a		1,1±0,1 a	1,2±0,1 a	1,1±0,1 a	1,2±0,0 a		1,1±0,1 ab	1,1±0,1 a	1,1±0,1 a	1,3±0,1 b*	
Cu 364,2±54,0 a	429,0±49,6 a	371,9±43,6 a	805,5±46,9 b		364,2±54,0 a	468,0±38,2 b	409,3±30,7 ab	829,3±19,6 c		364,2±54,0 a	441,5±37,8 a	440,9±42,4 a	871,7±70,2 b	
Mn 288,8±39,1 a	253,0±4,5 a	282,7±10,0 a	576,4±13,4 b		288,8±39,1 a	268,6±2,2 a*	236,9±5,4 a*	418,7±29,6 b*		288,8±39,1 a	308,3±9,4 a*	256,3±4,2 a*	523,3±37,9 b	

De um modo geral o Cd, ou não demonstrou afetar a concentração de Mg nos tecidos ou afetou negativamente, tal como descrito por alguns autores (De la Rosa *et al.*, 2004; Redondo-Gómez *et al.*, 2010; Lefèvre *et al.*, 2010; Marques & Nascimento, 2013). Contudo também já tem sido observado o efeito contrário. Em folhas de *Brassica juncea* e de *Arthrocnemum macrostachyum* a concentração de Mg aumenta com o aumento de Cd (Redondo-Gómez *et al.*, 2010; Mohamed *et al.*, 2012).

A concentração de K em folhas de plantas jovens é em média 46 % superior à de plantas adultas. A concentração deste elemento não apresenta diferenças estatisticamente significativas entre plantas contaminadas e controlo, sugerindo que o Cd não afeta a concentração de K em folhas.

Por outro lado, em pecíolos a concentração de K é significativamente superior em plantas contaminadas a partir do dia 7 e inferior em plantas jovens contaminadas, relativamente ao controlo. A concentração de K em pecíolos é em média 57 % superior em plantas jovens.

Nas raízes, as plantas adultas apresentam maior concentração deste elemento ($\approx 52\%$). Nestas plantas observa-se uma diminuição da concentração de K ao longo do tempo, mais acentuado para maiores concentrações de Cd, sendo que ao 7º e 14º dia as plantas expostas a 50 μM de Cd, são estatisticamente inferiores ao controlo. Em plantas jovens contaminadas também se observa o mesmo comportamento de diminuição da concentração de K, verificando-se uma diferença estatisticamente significativa entre controlo e contaminadas aos dias 2 e 14 de exposição. Apesar de existir uma diminuição do teor de K absorvido pelas raízes, a translocação para as folhas não parece ser grandemente afetada pois os teores de K nas folhas mantêm-se constantes. Deste modo verifica-se que o Cd afeta mais a absorção radicular do que a translocação para as folhas.

Os resultados demonstrados por outros autores são ambíguos, em *Pisum sativum* exposta a 50 μM de Cd verificou-se o aumento da concentração de K (Sandálio *et al.*, 2001), em *Brassica juncea* exposta a 50 e 200 μM de Cd diminui a concentração de K face ao controlo (Mohamed *et al.*, 2012) e em *Arabidopsis thaliana* ocorreu uma diminuição do teor de K quando exposta 50 μM de Cd e aumento quando exposta a 100 μM de Cd (Martinez- Penálver *et al.*, 2012). Contudo a menor concentração de K em pecíolos de plantas jovens e raízes de ambos os estados de desenvolvimento pode estar relacionada com o aumento de Ca livre no citosol que promove a abertura de canais de aniões e de saída de K, na membrana celular (DalCorso *et al.*, 2010).



A concentração de Fe em folhas de plantas jovens é aproximadamente 75 % superior às folhas de plantas adultas. Em plantas adultas, apesar de não serem verificadas diferenças significativas, verifica-se que a concentração de Fe é afetada negativamente até ao 7º dia de exposição. Ao 14º dia, existe um aumento desta concentração na presença de Cd, sugerindo um estímulo na absorção desse metal. Em plantas jovens a concentração de Fe apresenta um comportamento tendencial para diminuir na presença de Cd, sendo esta diferença estatisticamente significativa ao 14º dia de exposição. O Fe apresenta correlações elevadas em folhas de plantas jovens, diminuindo com o aumento da concentração de Cd nesse tecido. Em folhas de plantas adultas verificou-se uma elevada correlação positiva, apenas quando expostas a 25 µM de Cd. Observa-se aqui um comportamento semelhante ao observado para o Cu com as plantas jovens a mostrarem-se mais sensíveis ao efeito do Cd do que as plantas adultas, o que é de esperar face ao respetivo estado de desenvolvimento.

Em pecíolos a concentração Fe foi aproximadamente 82 % superior em plantas jovens, face às adultas. A tendência de uma diminuição da concentração de Fe, observada nas folhas, na presença de Cd, é nos pecíolos um comportamento estatisticamente significativo, pelo que se pode concluir que existindo um efeito do Cd na translocação do Fe para a parte aérea da planta, não é suficiente para provocar deficiência deste elemento.

A concentração de Fe em raízes de plantas adultas e jovens é semelhante, enquanto que na parte aérea apresenta concentrações muito superiores (≈ 82 %) em plantas jovens. Deste modo, verifica-se que a taxa de translocação de Fe é condicionada pelo estado de desenvolvimento da planta, sendo menor em plantas adultas. Apesar de em plantas adultas, o Cd não afetar a concentração deste metal, em plantas jovens verifica-se a sua diminuição sendo esta diferença estatisticamente significativa ao 7º dia de exposição.

Uma diminuição da concentração de Fe foi também detetada em *Atriplex halimus* com cerca de 60 dias de crescimento, mas exposta a 100 µM de Cd (Lefèvre *et al.*, 2010), o dobro da concentração mais elevada utilizada neste trabalho.

A diminuição da concentração de Fe em plantas jovens pode estar relacionada com a competição pelos mesmos transportadores (Clemens, 2006a; Gallego *et al.*, 2012), enquanto que em plantas adultas, devido às menores necessidades nutricionais e estado de desenvolvimento mais avançado a diminuição é menos evidente. Outros autores também verificaram a diminuição de Fe na presença de Cd, para concentrações mais elevadas (> 50 µM Cd) (Sandálio *et al.*, 2001; De la Rosa *et al.*, 2004; Lefèvre *et al.*, 2010). Clemens (2006a) refere que a limitação de Fe induz a absorção de Cd, demonstrando que pode existir uma



competição pelos mesmos transportadores. A limitação deste elemento, bem como de Mg, é associada a cloroses e/ou degradação do sistema fotossintético (DalCorso *et al.*, 2008; Marques & Nascimento, 2013). No entanto, no presente ensaio, não se observaram deficiências em Fe que justificassem a deteção de cloroses.

A concentração de Zn em folhas de plantas jovens controlo foi em média 27 % superior à concentração em folhas de plantas adultas, sendo que com a aplicação de Cd esta diferença diminui. Em plantas controlo a concentração de Zn não varia estatisticamente ao longo do tempo, enquanto que para plantas contaminadas se verifica o efeito negativo do Cd sobre este metal. Em folhas de plantas jovens a concentração de Zn é estatisticamente menor face ao controlo a partir do dia 7 para amostras sujeitas a 25 μM de Cd e a partir do dia 2 para amostras sujeitas a 50 μM de Cd. Em folhas de plantas adultas, esta diferença apenas se observa a partir do dia 14 para amostras sujeitas a 25 μM de Cd e a partir do dia 7 para amostras sujeitas a 50 μM de Cd. A observação de diferenças mais tardias pode estar relacionada com a quantidade de Cd nas folhas que é menor em plantas adultas, retardando os efeitos. O Zn apresentou correlações elevadas e negativas em qualquer parte das plantas jovens, demonstrando que o aumento de Cd leva à diminuição da concentração de Zn nos mesmos órgãos. Nas plantas adultas esta correlação elevada e negativa apenas se verifica em folhas.

Em pecíolos de plantas jovens a concentração de Zn também é superior ($\approx 25\%$), relativamente a plantas adultas. A concentração de Zn nestes tecidos diminui na presença de Cd, sendo também mais evidente em plantas jovens.

A concentração de Zn em raiz de plantas controlo é em média 18 % superior em plantas jovens, provavelmente devido às maiores necessidades nutricionais da planta. Em plantas contaminadas a concentração deste metal diminui significativamente a partir do 2º dia de ensaio. Em raiz de plantas adultas a concentração deste metal também é afetada pela presença de Cd, apesar das diferenças significativas serem apenas ao 14º dia de exposição a 50 μM de Cd, verificando-se um aumento da concentração de Zn nos tecidos.

Sandálio *et al.* (2001) em *Pisum sativum* e Lefèvre *et al.* (2010) em *Atriplex halimus*, também verificaram que Cd provoca a diminuição significativa da concentração de Zn em folhas, contudo em raiz de *Pisum sativum* não foram detetadas diferenças significativas.

Segundo Gallego *et al.* (2012) o Cd é absorvido pelos mesmos canais/transportadores que Ca, Mg, Cu, Fe e Zn, como ZIP-IRT1 (do inglês *zinc regulated transporter / iron regulated transporter*), NRAMP (do inglês *natural resistance-associated macrophage proteins*) e HMA4



(do inglês *heavy metal transporting ATPases*), por outro lado refere que a translocação é mediada por transportadores de Zn, ZNT1 (pertence ao grupo ZIP-IRT1) podendo justificar em plantas adultas o aumento da absorção radicular de Zn (utilização de vários transportadores) e a diminuição da concentração na parte aérea, consequência da menor translocação que pode surgir da competição pelo mesmo transportador. Nas plantas jovens, claramente que o Cd afetou a absorção de Zn pelas raízes, mas sem chegar a provocar deficiência na planta.

A concentração de Cu em folhas é 25 % superior em plantas jovens, relativamente a adultas. Apresenta uma diminuição estatisticamente significativa, em plantas jovens em relação ao controlo, quando exposta a 50 μ M Cd e a partir do dia 7 de exposição. Resultados semelhantes foram obtidos por Sandálio *et al.* (2001) em plantas de *Pisum sativum*. Para plantas adultas o Cd não demonstrou afetar a concentração de Cu em folhas. Verifica-se assim que o Cd pode afetar o teor de Cu em plantas jovens mas a partir de um certo nível de desenvolvimento da planta a toxicidade do Cd não afeta a translocação de Cu para as folhas, o que também pode estar relacionado com os níveis mais baixos de Cd nas plantas adultas em comparação com as plantas jovens.

Em pecíolos a concentração de Cu é superior em plantas adultas (65 %), não existindo diferenças significativas entre os teores de Cu nas plantas de controlo em relação às contaminadas com Cd (excepto para plantas jovens ao dia 7 e plantas adultas ao dia 2, com 50 μ M Cd).

Nas raízes a concentração de Cu é, em média, 87 % superior em plantas adultas face às jovens. Nas raízes de plantas jovens observa-se um aumento da concentração de Cu ao dia 14 quando expostas a Cd. Se se comparar este aumento de Cu nas raízes com a diminuição nas folhas pode-se concluir que a absorção radicular deste elemento não é afetada mas a translocação para a parte aérea sim. Assim, o Cu que não é translocado acumula-se nas raízes dando origem aos resultados observados. Estes resultados podem-se dever a uma competição com os transportadores de Cu no interior da planta ou pelos danos causados pelo stresse induzido pelo excesso de Cd.

A influência nos teores deste elemento em plantas de espinafre demonstrou assim ser em menor extensão, nomeadamente para plantas adultas, provavelmente porque o Cu apresenta outros transportadores específicos para além dos referidos anteriormente, tal como CTR/COPT (do inglês *copper transporter*) (DalCorso *et al.*, 2013).

A concentração de Mn em folhas, é neste caso, superior em plantas adultas, em média 77 % para todas as concentrações de Cd estudadas. A concentração de Mn aumenta ao longo do tempo para qualquer das condições, mas verificam-se menores concentrações de Mn na presença de Cd. O efeito negativo do Cd, nas concentrações deste elemento, é mais evidente em plantas jovens.

Nos pecíolos de plantas contaminadas verificou-se a diminuição significativa da concentração de Mn, em relação ao controlo.

Nas raízes das plantas controlo o valor inicial de Mn é inferior em plantas jovens, aumentando até valores semelhantes. Em plantas adultas verifica-se que a concentração de Mn diminui na presença de 25 μM Cd, a partir do 7º dia de exposição. Em plantas jovens verifica-se que, este efeito é mais acentuado, sugerindo o efeito negativo do Cd sobre a absorção de Mn por parte da planta.

O efeito negativo do Cd sobre a concentração de Mn, foi também observado por Sandálio *et al.* (2001) em plantas de *Pisum sativum* (14 dias desenvolvimento e 28 de contaminação) quando expostas a 40 e 50 μM Cd. Contudo um aumento significativo da concentração de Mn, também foi observado em folhas de *Brassica juncea* (7 dias desenvolvimento e 7 de contaminação) quando contaminadas com 50 μM Cd (Mohamed *et al.*, 2012).

De um modo geral pode-se afirmar que a concentração de Ca e Mn é crescente ao longo do tempo, tal como Mg (na parte aérea - observar setas/símbolos cinza, na tabela 5.4), enquanto que K, Cu, Fe e Zn diminuem ao longo do tempo de ensaio. As folhas jovens contêm maior concentração de K, Cu, Fe e Zn na parte aérea, relativamente às de plantas adultas que contêm mais Ca, Mg e Mn.

A concentração de elementos na presença de Cd foi mais afetada em plantas jovens, bem como nas folhas. A sensibilidade da planta jovem, ocorre provavelmente porque para os mesmos tempos de exposição a capacidade de absorção de Cd foi superior quando comparada com uma planta adulta (figura 5.2). A alteração da concentração de elementos essenciais na planta na presença de Cd depende não só da concentração deste e da espécie da planta, mas também das condições de ensaio e da fase de desenvolvimento da planta.



Tabela 5.4 – Tabela resumo de resultados de elementos determinados por EAA, representados nas tabelas 5.1, 5.2 e 5.3.

[Cd]	Ca		Mg		K		Cu		Fe		Zn		Mn	
	Jovem	Adulta	Jovem	Adulta	Jovem	Adulta	Jovem	Adulta	Jovem	Adulta	Jovem	Adulta	Jovem	Adulta
Folhas	0 µM	↑	↑ (49%)	↑	≈	≈ (27%)	≈	≈ (47%)	≈	≈	↓ (25%)	↓ (77%)	≈	↑ (72%)
	25 µM	↑	↑	↑ (44%)	↑	↓	≈	≈ (46%)	≈	≈	↓ (20%)	↓ (73%)	≈	↑ (81%)
	50 µM	↑	↑	≈	↓ (38%)	≈	↓	≈ (41%)	≈	≈	↓ (17%)	↓ (75%)	≈	↑ (77%)
Pecíolos	0 µM	≈	↑ (43%)	↑	↑	↑ (14%)	↓	↓ (69%)	↓	↓	≈	≈ (83%)	↑	≈ (30%)
	25 µM	≈	↑ (44%)	↑	≈	≈ (23%)	↓	↓ (55%)	≈	↑	↓	↓ (80%)	↓	↓ (26%)
	50 µM	≈	↑ (51%)	↑	≈	↑ (19%)	↓	↓ (47%)	≈	↑	↓	↓ (83%)	↓	↓ (37%)
Raiz	0 µM	≈	↑ (29%)	↓	↓	↓ (30%)	≈	↓	↑ (49%)	↑	≈	≈ (87%)	≈	↑ (n.a.)
	25 µM	≈	↑	≈	↓	↓ (23%)	≈	↓	↓ (59%)	↑	≈	≈ (87%)	≈	↑ (59%)
	50 µM	↑	↑	≈	↓	↓ (16%)	≈	↓	↓ (48%)	↑	≈	≈ (87%)	↑	↑ (26%)

↑ ↑ ≈ - aumenta, diminui ou mantém-se aproximadamente igual ao longo do tempo.

↑ ↓ ≈ - aumenta, diminui ou mantém-se igual relativamente ao controlo.

(20 %) - diferença percentual entre o estado de desenvolvimento, localiza-se no que for superior ao outro.

(n.a.) - quando a diferença percentual é abaixo de 10 %.

Tabela 5.5 – Coeficiente de correlação de Pearson entre a concentração de cada elemento e a concentração de Cd nas diferentes partes da planta, ao longo do tempo.

Cd	Ca		Mg		K		Cu		Fe		Zn		Mn	
	Jovem	Adulta	Jovem	Adulta	Jovem	Adulta	Jovem	Adulta	Jovem	Adulta	Jovem	Adulta	Jovem	Adulta
Folhas	25 µM	0,68	0,93	0,98	0,76	-0,84	-0,70	-0,92	-0,78	-0,96	0,88	-0,98	-0,97	1,00
	50 µM	0,95	0,62	-0,36	-0,58	-0,03	-0,74	-0,94	-0,76	-0,98	0,19	-0,96	-0,96	0,99
														0,94
Pecíolos	25 µM	0,42	0,38	0,08	0,94	-1,00	0,64	-0,64	0,71	-0,22	-0,08	-0,90	0,27	0,74
	50 µM	0,66	0,51	-0,40	0,46	-1,00	0,95	-0,77	0,11	-0,17	-0,34	-0,95	0,44	0,76
														-0,99
Raiz	25 µM	-0,43	0,62	-0,53	-0,86	-0,34	-0,86	-0,81	0,74	-0,03	-0,05	-0,94	0,55	0,70
	50 µM	0,29	0,45	-0,36	-0,87	-0,54	-0,92	-0,79	0,74	0,22	0,26	-0,90	0,55	0,72
														0,44
														-0,85
														0,44
														0,58

5.3.3. Caracterização do teor em clorofilas

A concentração de clorofila pode ser considerada um parâmetro de avaliação da extensão do stresse provocado pelo Cd, pois tal como descrito por outros autores e como foi no capítulo anterior, a presença de Cd provoca muitas vezes a diminuição da concentração de clorofila (Mohamed *et al.*, 2012; Marques & Nascimento, 2013; Martins *et al.*, 2013).

A concentração de clorofila *a* (figura 5.5) é semelhante em folhas jovens e adultas, enquanto que a clorofila *b* no dia 0 é menor em folhas jovens, diminuindo consequentemente a concentração de clorofila total. A clorofila *a*, demonstrou ser mais afetada pelo Cd do que a clorofila *b* em plantas adultas, existindo uma diminuição estatisticamente significativa desta ao 14º dia de exposição a Cd, face a plantas controlo. Em plantas jovens ao 14º dia ambas, clorofila *a* e *b*, diminuem significativamente em plantas contaminadas quando comparadas a plantas controlo. Nos gráficos de clorofila total (clorofila *a+b*) verifica-se que existe um comportamento de diminuição da concentração da clorofila em plantas expostas a Cd, diminuição estatisticamente significativa aos dias 7 e 14 em plantas jovens e dia 14 em plantas adultas. Não menos importante, são os aumentos significativos da concentração de clorofila ao dia 2 em plantas jovens e ao dia 7 em plantas adultas, representando um estímulo de Cd para o aumento da concentração de clorofila. Estas oscilações da concentração de clorofila não foram detetadas visivelmente tal como descrito no Cap.IV.

Redondo-Goméz *et al.* (2010) em *Arthrocnemum macrostachyum* (planta da mesma família que *Spinacea oleracea*) verificaram que para concentrações de 50 µM de Cd não se verificavam alterações na clorofila face ao controlo, apenas para concentrações acima de 200 µM de Cd. Tal como outros autores que verificaram o efeito negativo de Cd sobre as clorofilas, mas apenas para concentrações de Cd acima de 100 µM de Cd (Ekmekci *et al.*, 2008; Roychoudhury *et al.*, 2012). Por outro lado também existem plantas, como *Brassica juncea* e *Jatropha curcas*, que se demonstraram mais sensíveis e que quando sujeitas a concentrações de 5 a 50 µM de Cd apresentaram degradação de clorofilas ou do sistema fotossintético (Mohamed *et al.*, 2012; Marques & Nascimento, 2013).

Tal como já referido, a diminuição das concentrações de Fe e Mg pode estar relacionada com a degradação de clorofilas (DalCorso *et al.*, 2008; Marques & Nascimento, 2013). Contudo, de um modo geral, as correlações entre estes elementos em folhas e pecíolos com a clorofila total não demonstraram uma conexão entre a diminuição de clorofilas e a diminuição de Fe e Mg.

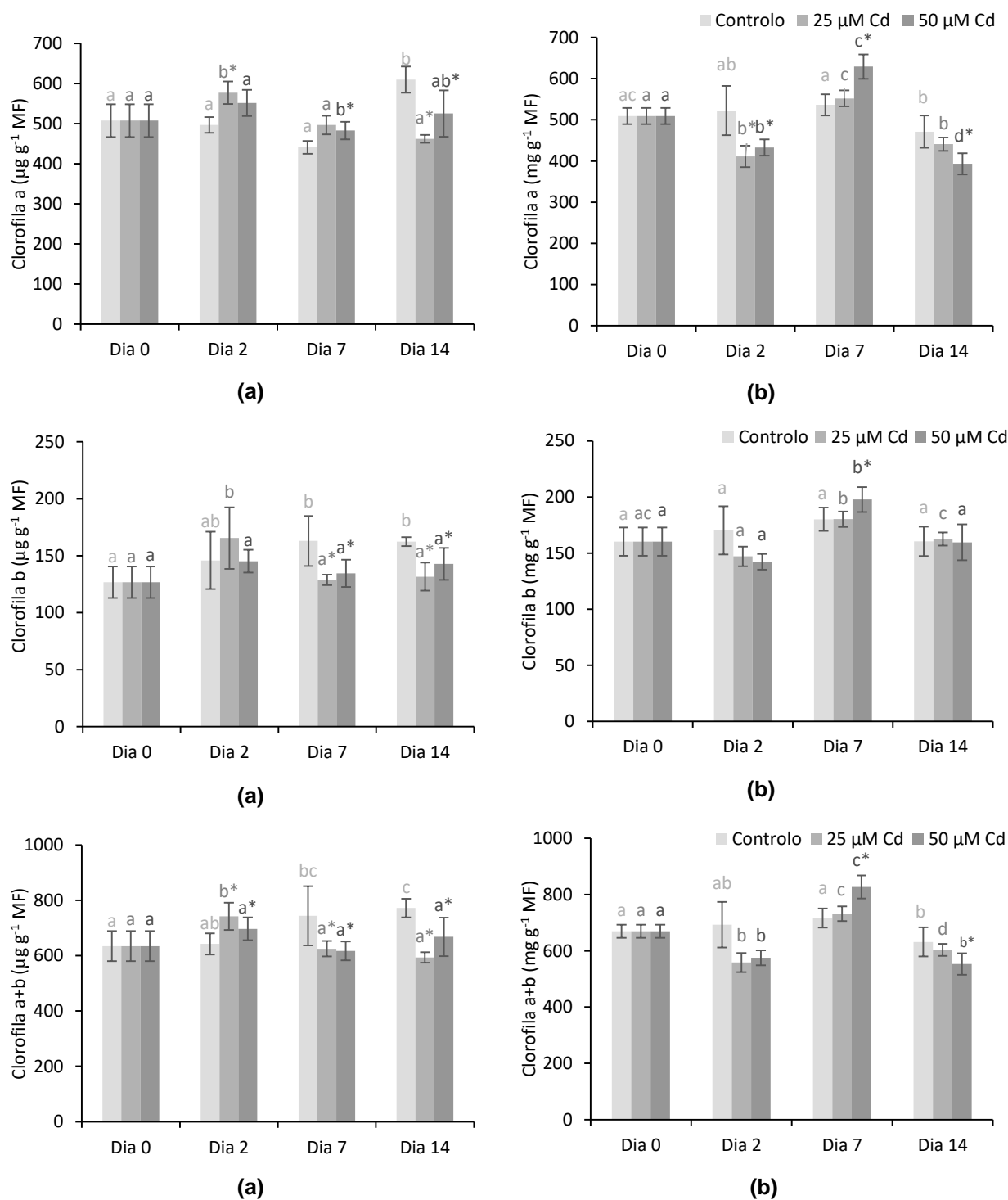


Figura 5.5 - Concentração de Clorofila a, b e total (a+b) ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF) em folhas de plantas jovens (a) e adultas (b), expostas a 25 μM Cd e 50 μM Cd durante 14 dias.

As barras de erro representam o desvio padrão, o asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle e as plantas contaminadas, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferença significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada contaminação ($n = 6$).

5.3.4. Parâmetros indicadores de stresse oxidativo: MDA e H₂O₂

A concentração de MDA pode ser considerada como um parâmetro de avaliação da ocorrência de danos oxidativos provocados pelos ROS como consequência do stresse oxidativo. Os teores de H₂O₂ podem dar uma indicação acerca dos teores de ROS existentes e dessa forma ser também considerado como um parâmetro indicador de stresse oxidativo.

O H₂O₂ é uma espécie reativa de oxigénio com baixa reatividade, mas facilmente determinada em laboratório, e é simultaneamente associada à toxicidade por metais pesados e à sinalização de stresse oxidativo (Møller *et al.*, 2007; DalCorso *et al.*, 2008; Mittler *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2013; Mourato *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos indicam uma concentração de H₂O₂ superior nas folhas, comparativamente com as raízes (figura 5.6). Pela análise destes resultados, podemos verificar que o Cd demonstrou induzir a produção de H₂O₂ em folhas de plantas de espinafre, tanto jovens como adultas, tal como verificado por outros autores (Schutzendudel *et al.*, 2001; Mobin & Khan, 2007; Martins *et al.*, 2010; Roychoudhury *et al.*, 2012). Em raízes não se verificou este resultado, existindo apenas diferenças estatisticamente significativas ao dia 2 em plantas contaminadas com 50 µM de Cd e ao dia 7 em plantas jovens contaminadas com 25 µM de Cd. Este facto pode estar relacionado com a existência de mecanismos de resposta responsáveis pela degradação e/ou eliminação do H₂O₂ ou outros tipos de ROS formados.

A produção de ROS está associada à oxidação lipídica, que pode ser detetada pela determinação de malondialdeído (MDA). O MDA é um produto da peroxidação dos lípidos, indicando uma degradação dos constituintes membranares de natureza lipídica, como referido. Tanto em folhas de plantas jovens, como em folhas de plantas adultas (figura 5.7), verifica-se o aumento deste composto para tempos de exposição mais longos; contudo em raiz este efeito não é estatisticamente significativo, como foi também observado por Mohamed *et al.* (2012) em plantas de *Brassica juncea*.

Outros autores verificaram o aumento da concentração de MDA com a exposição a Cd em diferentes plantas (Ammar *et al.*, 2008a; Ghnaya *et al.*, 2005; Lefèvre *et al.*, 2010; Roychoudhury *et al.*, 2012).

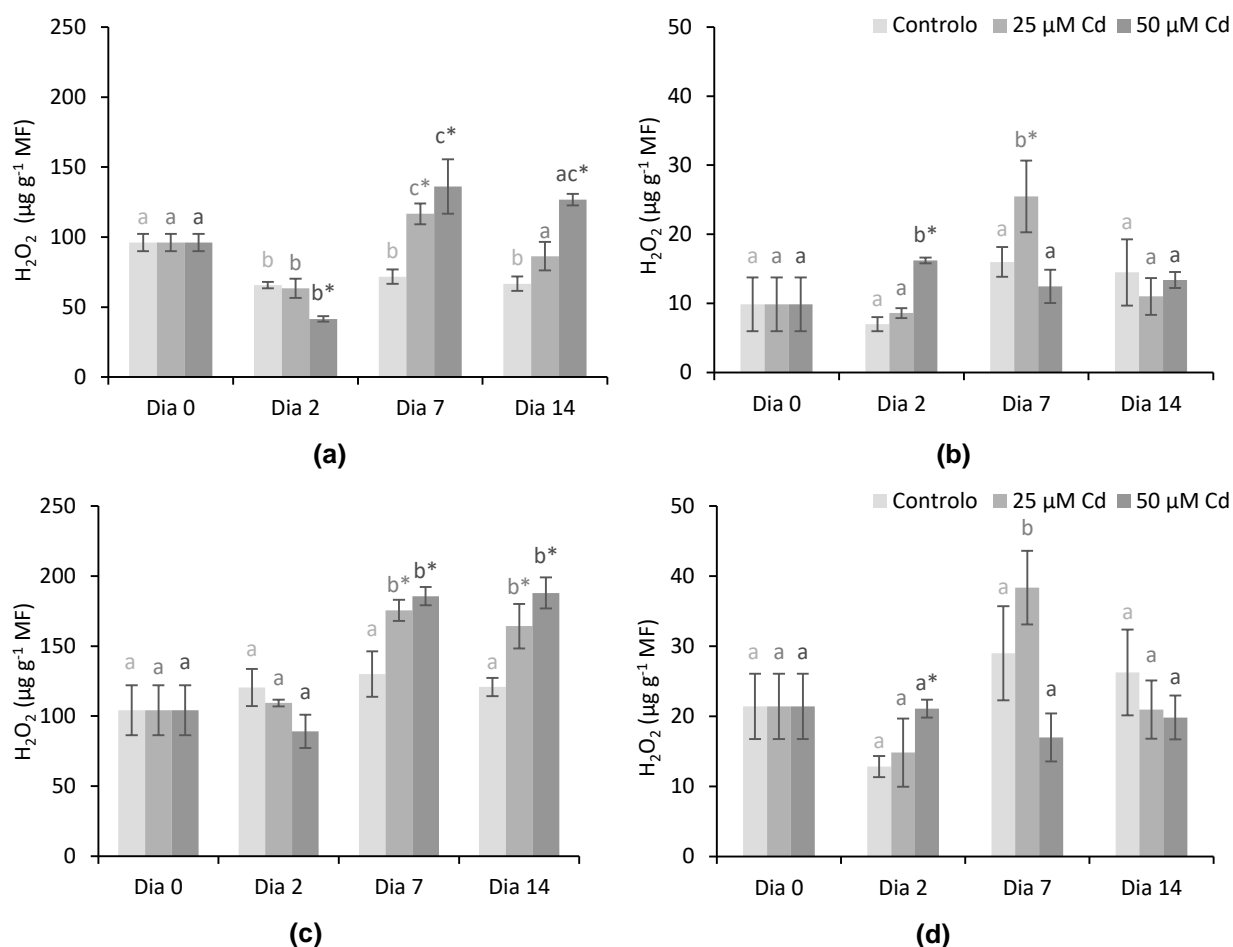


Figura 5.6 - Concentração de H_2O_2 ($\mu g\ g^{-1}\ MF$) em plantas jovens (a-folhas, b-raízes) e em plantas adultas (c-folhas e d-raízes) expostas a 0 (controlo), 25 μM Cd e 50 μM Cd, durante 14 dias.

As barras de erro representam o desvio padrão, o asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controlo e as plantas contaminadas, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferença significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada contaminação ($n = 3$).

A comparação dos níveis de peróxido de hidrogénio e malondialdeído obtidos em folhas e raízes parecem indicar que as raízes são órgãos menos suscetíveis ao stresse induzido pelo Cd. O facto de não se observarem diferenças significativas nos teores de H_2O_2 nas raízes, apesar de ser o órgão com maior concentração de Cd acumulado, demonstra o eficiente sistema antioxidante da planta de espinafre, o que é confirmado pela ausência de peroxidação lipídica nestes órgãos ao contrário do que acontece nas folhas.

Na tabela 5.6 apresentam-se as correlações de *Pearson* entre a concentração de Cd em folhas e raízes e os parâmetros de avaliação da extensão do stresse, ao longo do tempo. Pela análise destes valores verifica-se que a concentração de Cd em folhas se correlaciona



fortemente com a concentração de MDA, tanto em plantas jovens como adultas, significando que com o aumento do Cd nos tecidos aumenta a concentração de MDA em folhas.

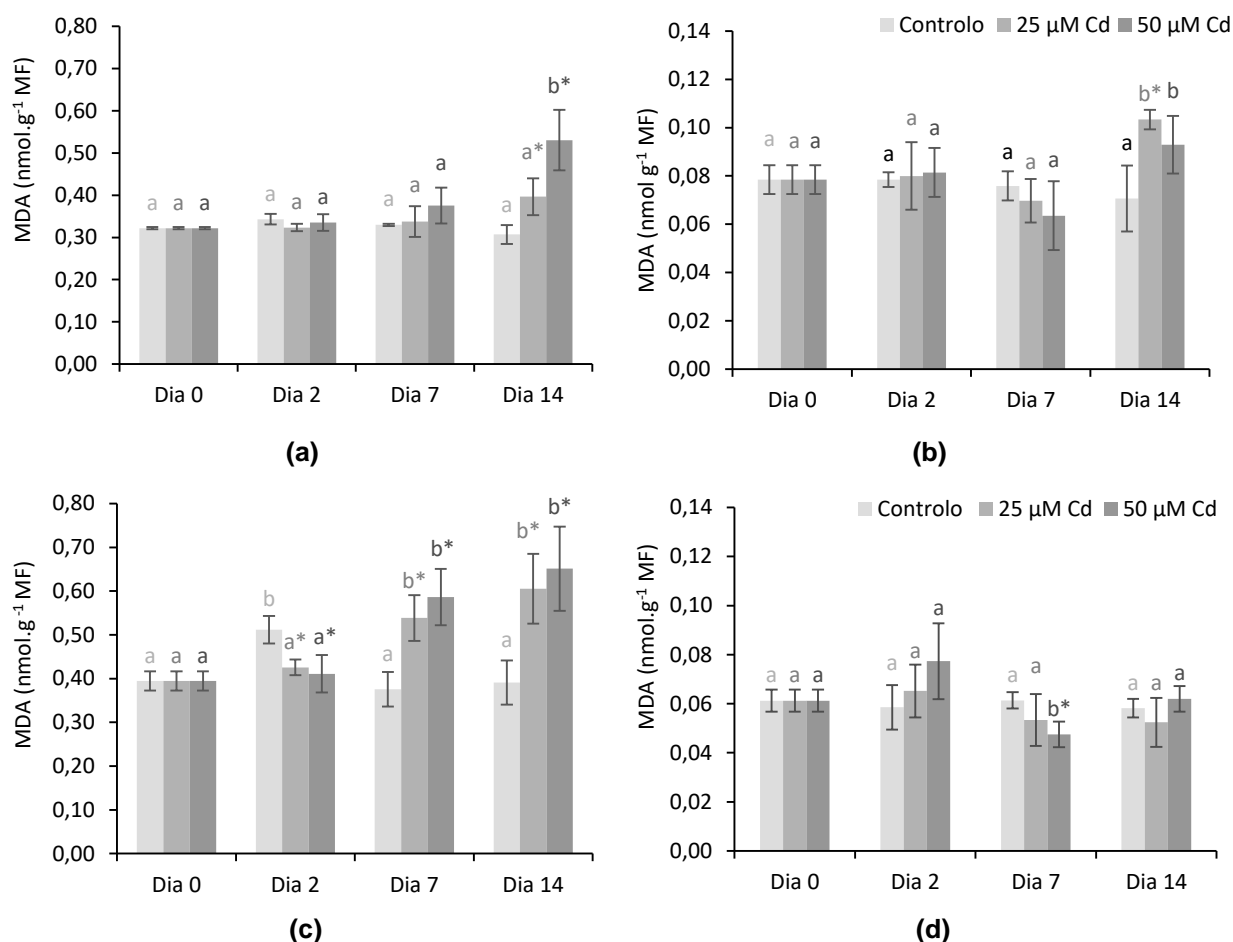


Figura 5.7 - Concentração de malondialdeído (MDA) (nmol g⁻¹ MF) em folhas e raízes de plantas de espinafre jovens (a-folhas; b-raízes) e adultas (c-folhas; d-raízes), expostas a 0 (controle), 25 μM Cd e 50 μM Cd durante 14 dias.

As barras de erro representam o desvio padrão, o asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle e as plantas contaminadas, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferença significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada contaminação ($n = 3$).

As concentrações de MDA e de H₂O₂ em folhas também apresentam uma correlação elevada, demonstrando que o aumento da produção de H₂O₂ pode levar ao aumento da concentração de MDA. De facto a produção de H₂O₂ é geralmente associada à degradação lipídica detetada pela produção de MDA.

Por outro lado a correlação de Cd nos tecidos com a concentração de H₂O₂, bem como com a clorofila é média ou baixa.

**Tabela 5.6** - Coeficientes de correlação de Pearson entre a concentração de Cd em folhas e raízes e os parâmetros indicadores da extensão de stresse oxidativo, ao longo do tempo.

		Cd		Clorofila		MDA	
		Jovens	Adultas	Jovens	Adultas	Jovens	Adultas
Clorofila	25 µM Cd	-0,66	-0,11				
	50 µM Cd	-0,15	-0,40				
MDA em folhas	25 µM Cd	0,90	0,96	-0,67	0,11		
	50 µM Cd	0,87	0,87	0,13	0,09		
MDA em raiz	25 µM Cd	0,61	-0,54				
	50 µM Cd	0,30	-0,05				
H ₂ O ₂ em folhas	25 µM Cd	0,27	0,77	-0,67	0,44	0,02	0,92
	50 µM Cd	0,72	0,74	-0,76	0,32	0,55	0,97
H ₂ O ₂ em raiz	25 µM Cd	0,31	0,11			-0,52	-0,66
	50 µM Cd	0,32	-0,49			0,24	0,81

5.3.5. Sistema Antioxidante não enzimático

Para avaliação do sistema antioxidante não enzimático foram determinados os seguintes compostos: o ascorbato, a prolina, os carotenoides, AO, GSH e PC. Alguns destes compostos estão associados a uma função antioxidante, por se oxidarem preferencialmente e desta forma eliminarem os ROS, outros por serem substratos de enzimas responsáveis pela atividade antioxidante, ou ainda por formarem complexos com o Cd, como as PC e AO.

O ascorbato é um composto essencial para as plantas, com importantes funções como antioxidante e modulador do crescimento de plantas através da sinalização hormonal (Valpuesta *et al.*, 2004) e com um papel essencial em múltiplos processos fisiológicos (Zhang, 2013), alguns dos quais são afetados pelo excesso de metais.

Na figura 5.8 apresentam-se os resultados do teor de ascorbato reduzido (AsA) e de ascorbato total (AsC). A concentração de AsA em plantas de espinafre aumentou na presença de Cd, com excepção de plantas adultas ao 7º dia de contaminação e ao 14º dia quando contaminadas com 25 µM de Cd. O aumento foi mais evidente em plantas jovens, o que pode indicar um papel mais relevante nestas plantas. Loscos *et al.* (2008), referem a diminuição da produção de AsA em *Phaseolus vulgaris* exposto a Cd, tal como outros autores noutras espécies (Aravind & Prasad, 2005; Mohamed *et al.*, 2012). Contudo Mohamed *et al.* (2012) demonstrou em *Brassica juncea*, que essa diminuição ocorre a concentrações de 200 µM de Cd, mas que quando exposta a concentrações de 50 µM de Cd a concentração de AsA



aumentou. Esse aumento foi também observado por outros autores em *Arabidopsis thaliana* e *Phaseolus vulgaris* expostas a Cd, sendo coerentes com os dados obtidos em *Spinacea oleracea* (Smeets *et al.*, 2005; Smeets *et al.*, 2009).

O aumento da concentração de ascorbato observado pode ser justificado com um aumento da síntese deste composto em resposta ao stresse induzido pelo Cd, tendo em atenção o importante papel que o ascorbato tem quer como antioxidante independente, quer como participante nas vias metabólicas associadas à resposta antioxidante da planta.

A determinação de ascorbato total e reduzido foi realizada apenas em folhas, devido à baixa produção de massa de raízes pelas plantas de espinafre.

Os resultados da concentração de prolina obtidos foram, na maioria das amostras, abaixo do limite de deteção do método, e quando acima apresentaram desvios padrão muito elevados, por esse motivo não foram considerados para estas amostras. Alguns autores referem o aumento da concentração de prolina, não como resultado direto da absorção de metais pesados, mas devido ao distúrbio provocado no balanço de água (Clemens, 2006a; Fernández *et al.*, 2013a). Talvez a baixa ou nula alteração do balanço de água em espinafre seja uma consequência dos resultados da concentração de prolina obtidos.

A concentração de carotenoides totais, determinados por EAM (figura 5.9) aumenta significativamente em plantas jovens contaminadas, em relação ao controlo, ao 2º dia de exposição, mas diminui ao 7º e 14º dia, excetuando dia 14 a 50 µM Cd. Em plantas adultas esta variação é menos evidente, existe uma diminuição significativa da concentração de carotenoides ao dia 2, mas nos restantes dias do ensaio essas diferenças não são significativas.

Comparando os valores de carotenoides totais obtidos por EAM (figura 5.9) e HPLC (figura 5.10) verifica-se o comportamento de amostra é semelhante existindo uma maior influência do Cd em plantas jovens, quando comparando com plantas adultas.

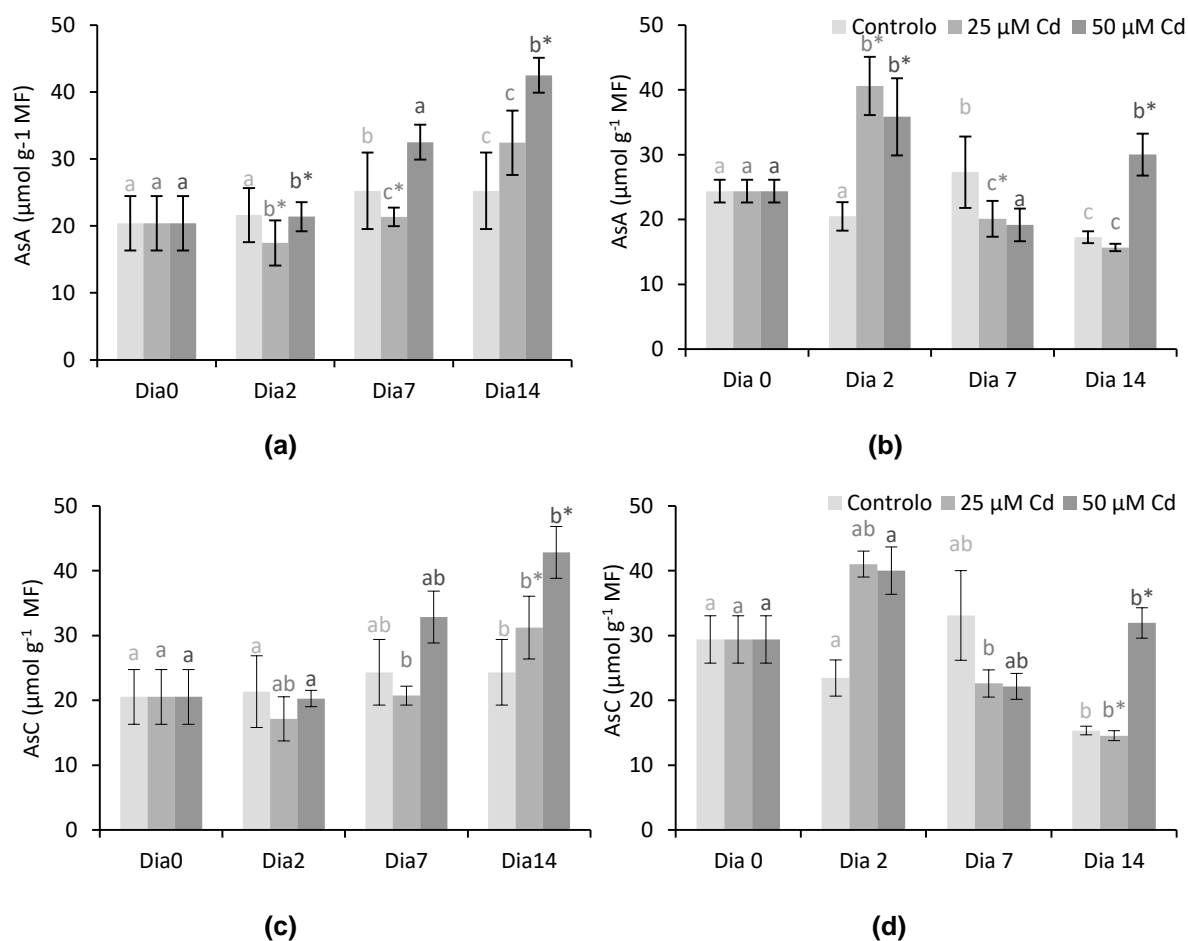


Figura 5.8 - Concentração de ascorbato reduzido (AsA) e de ascorbato total (AsC) em folhas de plantas jovens (a – AsA e c - AsC) e adultas (b – AsA e d - AsC), expostas a 25 μM Cd e 50 μM Cd durante 14 dias.

As barras de erro representam o desvio padrão, o asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controlo e as plantas contaminadas, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferença significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada contaminação ($n = 3$).

Os carotenóides têm um importante papel em proteger as clorofilas recebendo a energia em excesso e atuando como antioxidantes (Jomava & Valko, 2013) pelo que a ligeira diminuição do teor destes pigmentos observada nas folhas de plantas jovens pode estar relacionada com a sua ação de proteção contra o stresse induzido, não sendo devidamente compensada pela síntese de novas moléculas.

Por HPLC, é possível não só determinar os carotenoides totais, mas também quantificá-los individualmente. Neste trabalho foi possível distinguir o α -caroteno, β -caroteno, neoxantina, violoxantina, anteroxantina, luteína e zeaxantina, como é visível no cromatograma da figura 5.11.

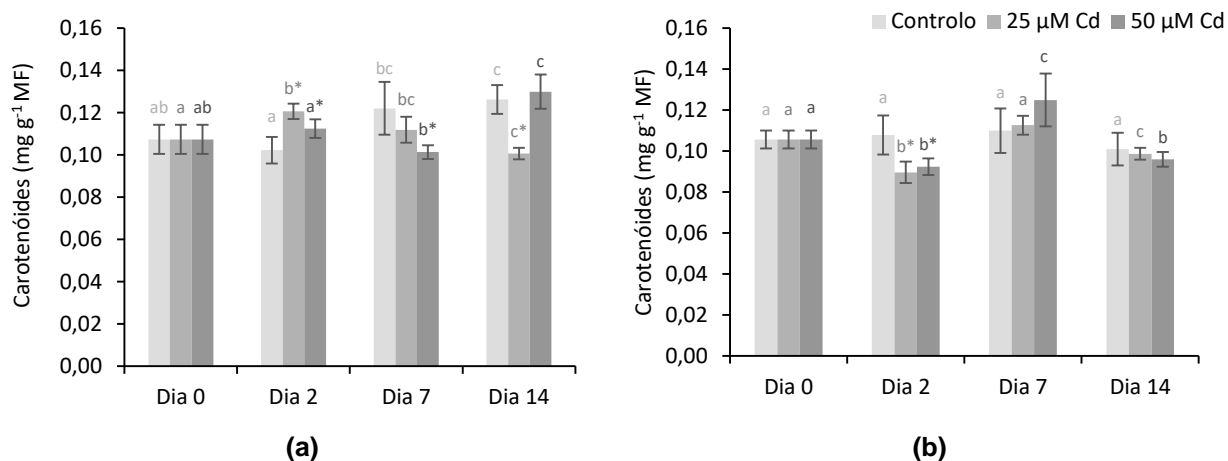


Figura 5.9 - Concentração de carotenóides totais (mg g⁻¹ MF) em folhas de plantas jovens (a) e adultas (b), expostas a 0 (controlo), 25 μM Cd e 50 μM Cd durante 14 dias (método espectrofotométrico).

As barras de erro representam o desvio padrão, o asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controlo e as plantas contaminadas, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferença significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada contaminação ($n = 6$).

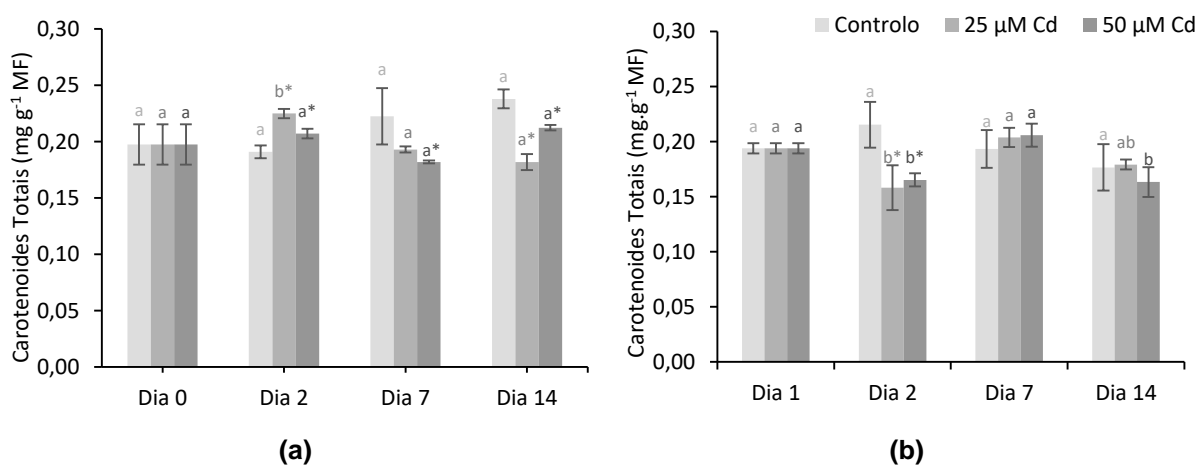


Figura 5.10 - Concentração de Carotenoides totais (mg g⁻¹ MF) em folhas de plantas jovens (a) e adultas (b), expostas a 25 μM Cd e 50 μM Cd durante 14 dias (por HPLC).

As barras de erro representam o desvio padrão, o asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controlo e as plantas contaminadas, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferença significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada contaminação ($n = 3$).

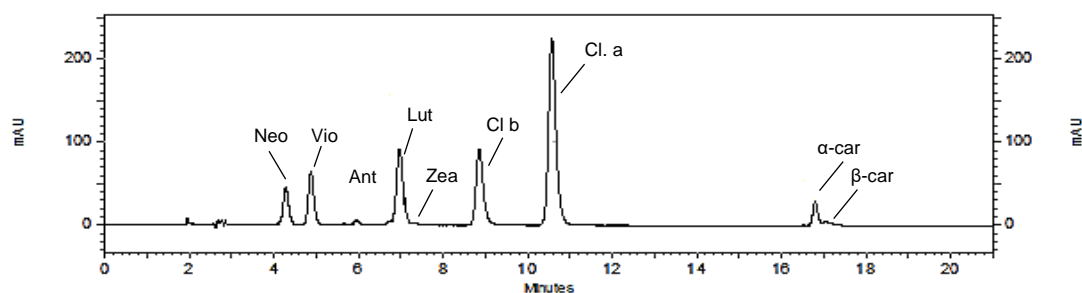


Figura 5.11 - Cromatograma de carotenoides presentes em folhas de espinafre controlo de dia 2. Neo: neoxantina; Vio: vioxantina; Ant: anteroxantina; Zea: zeaxantina; Cl. b: clorofila b; Cl. a: clorofila a; α-car: α-caroteno; β-car: β-caroteno.

Na tabela 5.7, estão indicados os valores de concentração de carotenoides ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF) obtidos nas folhas de espinafre sem contaminação (controlo) e expostas a 25 μM Cd e 50 μM Cd durante 14 dias. Pela análise destes resultados confirma-se o efeito dos carotenoides face ao stresse induzido por Cd, que se pode observar pela sua diminuição na presença de Cd e com o tempo de exposição.

A concentração de carotenos (α e β) em plantas adultas, aumenta com o aumento da concentração de Cd, mas tende a diminuir para tempos de exposição mais longos (14 dias), embora sem diferenças estatisticamente significativas por comparação com o controlo. Em plantas jovens, o comportamento é semelhante, mas sem apresentar diferenças significativas. Sabendo que a exposição ao Cd induz stresse oxidativo, como já foi verificado em alguns resultados apresentados anteriormente, esta condição pode causar maior oxidação de carotenos, pelo que foram detetados em concentrações mais baixas. Contudo os carotenos apenas representam, no máximo 12 % (dia 2, contaminadas) dos carotenoides totais em plantas adultas e 11 % em plantas jovens (dia 7, 50 μM Cd).

O comportamento dos carotenoides totais (figuras 5.9 e 5.10), quer em plantas adultas, quer em plantas jovens é resultado do comportamento da Lut, Vio e Neo que apresentam, respetivamente, no máximo 52 %, 26 % e 21 % dos carotenoides totais em plantas adultas e 47 %, 28 % e 18 % em plantas jovens.

Em plantas adultas, apesar da Vio diminuir na presença de Cd, a Lut e a Neo aumentam estatisticamente ao 7º dia de exposição face ao controlo, diminuindo ao 14º dia, sem diferenças significativas. Por consequência destes comportamentos a concentração total de carotenoides não apresenta diferenças estatisticamente significativas face ao controlo. Em plantas jovens a diminuição destas xantofilas (Lut, Neo e Vio), bem como da Ant na presença

de Cd, deve-se provavelmente à sua oxidação de modo a proteger a célula contra o stresse induzido.

A Neo apesar de descrita por outros autores como não respondendo ao stresse ambiental/abiótico demonstrou variação de concentração na presença de Cd, principalmente em plantas de espinafre jovens, podendo estar relacionada com a sua ação antioxidante (Esteban *et al.*, 2015).

A Vio, Ant e Zea fazem parte do ciclo das xantofilas (figura 5.1) representando um mecanismo foto-protetor da célula (Esteban *et al.*, 2015). Apesar de neste trabalho se ter induzido um stresse por metais pesados, este ciclo demonstrou ter sido afetado, sendo o efeito mais visível em plantas jovens.

Em plantas jovens, ao segundo dia do ensaio, verifica-se um aumento de Lut, Vio e Neo, o que pode indicar uma ativação deste ciclo aumentando a produção destas espécies. A partir do dia 7, as respetivas concentrações diminuem em relação ao controlo, indicando que a sua utilização em resposta ao stresse induzido não está a ser compensada pela síntese de novas moléculas. Ou seja, o β -caroteno produzido está a ser utilizado como resposta ao stresse, reduzindo a produção dos outros pigmentos do ciclo, Zea, Ant, Vio e Neo, como indicado na figura 5.1. Por outro lado, existe também a hipótese das enzimas deste ciclo estarem a ser afetadas pelo Cd em excesso, sendo este efeito mais visível a partir do dia 7 devido à maior concentração de Cd detetada em folhas a partir deste dia (figura 5.2).

Em plantas adultas o efeito é bastante menos visível, o que estará relacionado com o estado de desenvolvimento da planta e com a menor concentração de Cd nos tecidos (figura 5.2).

Observa-se um aumento dos teores de α -caroteno e da xantofila derivada, a Lut, o que pode indicar uma resposta ao stresse induzido. Nas plantas sujeitas a 50 μ M de Cd, as variações são mais significativas, principalmente a partir do dia 7, observando-se um aumento significativo da Neo, associado a uma diminuição de Ant e Vio, o que pode ser indicativo do papel importante que esta xantofila tem na resposta ao stresse aplicado.

Em plantas jovens são os carotenoides Ant, Vio, Neo e Lut, que demonstraram por diminuição da sua concentração, uma possível ação antioxidante face ao stresse induzido pelo Cd. A diminuição da concentração destes carotenoides, reflete-se na diminuição da concentração total (figura 5.9) na presença de Cd, tal como descrito anteriormente por outros autores (Ekmekci *et al.*, 2008; Huang & Wang, 2010; Molnárová & Fargášová, 2012).

**Tabela 5.7 – Concentração de carotenoides ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF) em folhas de espinafre expostas a 0 (controle), 25 μM Cd e 50 μM Cd durante 14 dias.**

O símbolo \pm representa o desvio padrão. O asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle e as plantas contaminadas, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada contaminação ($n = 3$). O sombreado verde representa um aumento significativo e o sombreado laranja representa uma diminuição significativa, face ao controle.

Folhas de espinafre jovem – Controle					Folhas de espinafre jovem – 25 μM Cd					Folhas de espinafre jovem – 50 μM Cd				
Dias					Dias					Dias				
0	2	7	14		0	2	7	14		0	2	7	14	
α-car	14,89 \pm 0,83 a	13,98 \pm 2,84 a	14,34 \pm 1,14 a	18,79 \pm 0,35 a	14,89 \pm 0,83 a	15,13 \pm 1,40 a	14,93 \pm 1,07 a	15,41 \pm 1,41 a		14,89 \pm 0,83 a	14,02 \pm 1,77 a	17,40 \pm 2,42 a	17,76 \pm 1,41 a	
Lut	85,39 \pm 1,97 a	88,70 \pm 0,62 a	95,58 \pm 0,51 b	107,92 \pm 3,22 c	85,39 \pm 1,97 a	106,58 \pm 3,36 b*	90,47 \pm 2,40 a	84,14 \pm 2,50 a*		85,39 \pm 1,97 a	97,99 \pm 3,27 b*	85,06 \pm 2,87 a*	96,86 \pm 0,27 b*	
β-car	2,88 \pm 0,27 a	3,21 \pm 0,09 a	3,60 \pm 0,60 a	3,73 \pm 0,67 a	2,88 \pm 0,27 a	3,50 \pm 0,63 a	2,88 \pm 0,39 a	2,51 \pm 0,23 a		2,88 \pm 0,27 a	3,08 \pm 0,59 a	3,39 \pm 0,25 a	3,01 \pm 0,42 a	
Zea	1,31 \pm 0,09 a	0,88 \pm 0,06 b	0,65 \pm 0,02 c	0,69 \pm 0,07 bc	1,31 \pm 0,09 a	0,81 \pm 0,06 b	0,51 \pm 0,09 c	0,44 \pm 0,07 c		1,31 \pm 0,09 a	0,52 \pm 0,10 b*	0,96 \pm 0,03 c*	0,67 \pm 0,03 b	
Ant	5,87 \pm 0,62 a	4,16 \pm 0,09 b	4,16 \pm 0,53 b	3,98 \pm 0,31 b	5,87 \pm 0,62 a	3,67 \pm 0,08 b*	3,27 \pm 0,05 b*	2,20 \pm 0,15 c*		5,87 \pm 0,62 a	3,35 \pm 0,07 b*	3,19 \pm 0,02 b*	3,21 \pm 0,38 b*	
Vio	48,64 \pm 4,24 a	46,10 \pm 0,21 a	58,15 \pm 6,27 a	57,57 \pm 6,07 a	48,64 \pm 4,24 a	58,40 \pm 1,84 b*	48,94 \pm 0,34 a	45,91 \pm 1,81 a*		48,64 \pm 4,24 ab	53,51 \pm 1,87 ac*	41,38 \pm 0,85 b*	63,45 \pm 6,67 c	
Neo	33,03 \pm 3,01 a	31,66 \pm 0,17 a	37,11 \pm 0,72 ab	41,62 \pm 1,70 b	33,03 \pm 3,01 a	38,69 \pm 1,37 b*	31,95 \pm 0,51 a*	31,24 \pm 1,36 a*		33,03 \pm 3,01 a	35,79 \pm 1,07 a*	31,98 \pm 0,62 a*	35,77 \pm 2,05 a	
Folhas de espinafre adulto – Controle					Folhas de espinafre adulto – 25 μM Cd					Folhas de espinafre adulto – 50 μM Cd				
Dias					Dias					Dias				
0	2	7	14		0	2	7	14		0	2	7	14	
α-car	12,58 \pm 0,65 a	10,93 \pm 1,07 a	7,51 \pm 1,61 a	12,49 \pm 1,95 a	12,58 \pm 0,65 a	16,24 \pm 2,21 a*	11,21 \pm 1,28 a*	14,32 \pm 2,22 a		12,58 \pm 0,65 a	16,35 \pm 1,11 b*	12,82 \pm 1,17 a*	13,04 \pm 1,32 ab	
Lut	91,05 \pm 1,20 a	100,12 \pm 15,10 a	91,88 \pm 8,30 a	83,55 \pm 10,79 a	91,05 \pm 1,20 ab	82,28 \pm 4,04 a	99,35 \pm 5,87 b	91,29 \pm 1,76 ab		91,05 \pm 1,20 a	79,07 \pm 5,06 a	110,21 \pm 6,46 b*	84,27 \pm 7,11 a	
β-car	3,36 \pm 0,60 a	3,59 \pm 0,27 a	2,73 \pm 0,28 a	2,76 \pm 0,49 a	3,36 \pm 0,60 a	3,09 \pm 0,36 a	4,12 \pm 0,51 a*	3,16 \pm 0,26 a		3,36 \pm 0,60 ab	3,20 \pm 0,52 ab	4,73 \pm 0,78 a*	2,61 \pm 0,36 b	
Zea	0,92 \pm 0,06 a	1,32 \pm 0,13 a	0,24 \pm 0,04 b	0,45 \pm 0,07 a	0,92 \pm 0,06 a	0,39 \pm 0,15 b	0,25 \pm 0,05 b	0,28 \pm 0,05 b*		0,92 \pm 0,06 a	0,40 \pm 0,10 b	0,71 \pm 0,10 ac*	0,50 \pm 0,07 bc	
Ant	3,01 \pm 0,03 a	2,00 \pm 0,30 b	1,42 \pm 0,07 c	1,95 \pm 0,19 c	3,01 \pm 0,03 a	1,87 \pm 0,19 b	1,40 \pm 0,13 c	1,62 \pm 0,19 bc		3,01 \pm 0,03 a	1,99 \pm 0,17 b	1,39 \pm 0,07 c	1,11 \pm 0,15 d*	
Vio	45,25 \pm 1,16 a	48,07 \pm 2,97 a	50,83 \pm 4,45 a	41,91 \pm 4,30 a	45,25 \pm 1,16 a	32,83 \pm 3,50 b*	48,99 \pm 2,42 a	35,39 \pm 1,13 b		45,25 \pm 1,16 a	34,23 \pm 1,34 b*	30,79 \pm 1,74 b*	30,36 \pm 2,59 b*	
Neo	35,75 \pm 1,20 a	37,69 \pm 2,76 a	36,51 \pm 2,80 a	33,47 \pm 3,69 a	35,75 \pm 1,20 ab	30,65 \pm 1,05 b	38,97 \pm 2,07 a	33,04 \pm 0,86 b		35,75 \pm 1,20 a	29,88 \pm 1,00 b	43,71 \pm 2,58 c*	30,10 \pm 2,24 b	



Para as PC e AO, apenas foram efectuadas determinações em plantas adultas, dado que estas foram efectuadas na Universidade de Oviedo (Espanha) e na altura em que as determinações foram efectuadas ainda não tinham sido realizados os ensaios com plantas jovens, não tendo sido possível, mais tarde, uma nova deslocação a esta Universidade, para novas determinações analíticas.

A avaliação de PC e GSH em plantas é importante pois estas moléculas podem constituir uma estratégia importante no mecanismo de resposta a situações de contaminações por Cd. As PC e MT são descritas como as duas principais classes de péptidos, capazes de formar complexos com o Cd (Hall, 2002), pois atuam sobre este metal no citoplasma das plantas podendo dessa forma minimizar a concentração de Cd livre (Verkleij *et al.*, 2009; Saraswat & Rai, 2011, Choppala *et al.*, 2014).

Em folhas de espinafre adulto (tabela 5.8) observou-se um aumento da concentração de GSH aos dias 2 e 7 das plantas contaminadas com 25 μM em relação ao controlo, mas ao dia 14 o valor já foi menor. Estes resultados podem indicar uma resposta inicial da glutathione, sendo a sua síntese aumentada para combater o stresse induzido pelo Cd. A partir do dia 7 são detetadas fitoquelatinas, com maior intensidade no dia 14, coincidente com a diminuição da glutathione. Assim, pode-se deduzir que a glutathione é uma resposta inicial direta, mas a partir de um determinado tempo vai servir para a síntese de fitoquelatinas, que serão uma resposta de defesa a um tempo mais longo, justificando-se assim a sua redução ao dia 14. Nas folhas de plantas sujeitas a 50 μM de Cd este efeito já não é tão visível provavelmente porque a glutathione está mais envolvida no combate ao stresse, não se chegando a detetar o aumento observado na concentração de Cd mais baixa. A suportar estes resultados está o facto dos teores de PC serem bastante mais elevados para a maior concentração de Cd. As PC foram detetadas em folhas contaminadas a partir do 7º dia de contaminação, com a ordem de concentração $\text{PC2} > \text{PC3} > \text{Cys-PC2} > \text{PC4}$, contudo a PC4 foi detetada em folhas contaminadas com 25 μM de Cd apenas ao 14º dia.

Em raiz, a concentração de GSH apresentou uma tendência geral para diminuir com o tempo de exposição e com a contaminação de Cd (tabela 5.9), com a exceção do dia 7 a 50 μM . Resultados semelhantes foram descrito por Ammar *et al.* (2008b), que observaram uma redução da concentração de GSH em *Lycopersicon esculentum* exposto a 50 μM de Cd e Hawrylak-Nowak *et al.* (2014) que, em *Cucumis sativus* exposto a 25 e 50 μM de Cd, verificaram uma diminuição significativa da concentração de GSH em raiz, acompanhada de um aumento significativo em folhas.

**Tabela 5.8** – Concentração de PC e GSH (nmol GSH g⁻¹ MF) em folhas de plantas de espinafre adultas, expostas a 0 (controle), 25 µM Cd and 50 µM Cd durante 14 dias.

O símbolo ± representa o desvio padrão. O asterisco indica diferenças significativas (p < 0,05) entre o controle e as plantas contaminadas, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferença significativas (p < 0,05) entre os dias para cada contaminação (n = 3). O sombreado verde representa um aumento significativo e o sombreado laranja representa uma diminuição significativa, face ao controle.

Tíóis	Folhas de espinafre – Controle				Folhas de espinafre – 25 µM Cd				Folhas de espinafre – 50 µM Cd			
	Dias				Dias				Dias			
	0	2	7	14	0	2	7	14	0	2	7	14
GSH	1,077 ± 0,148a	0,988 ± 0,100a	0,998 ± 0,170a	1,102 ± 0,161a	1,077 ± 0,148a	1,121 ± 0,018a*	1,187 ± 0,057a*	0,846 ± 0,099b	1,077 ± 0,148a	0,821 ± 0,118b*	1,010 ± 0,111ab	0,948 ± 0,112b
PC2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,090 ± 0,005b*	0,202 ± 0,022c*	nd	nd	0,094 ± 0,005b*	0,398 ± 0,046c*
Cys-PC2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,015 ± 0,002b*	0,021 ± 0,002c*	nd	nd	0,058 ± 0,005b*	0,121 ± 0,010c*
PC3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,030 ± 0,000b*	0,066 ± 0,000c*	nd	nd	0,117 ± 0,000b*	0,275 ± 0,000c*
PC4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,021 ± 0,004b*	nd	nd	0,028 ± 0,004b*	0,083 ± 0,013c*
PCs Totais	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,136 ± 0,006b*	0,404 ± 0,023c*	nd	nd	0,202 ± 0,007b*	0,877 ± 0,048c*

Tabela 5.9 – Concentração de PCs e GSH (nmol GSH g⁻¹ MF) em raiz de plantas de espinafre adultas, expostas a 0 (controle), 25 µM Cd and 50 µM Cd durante 14 dias.

O símbolo ± representa o desvio padrão. O asterisco indica diferenças significativas (p < 0,05) entre o controle e as plantas contaminadas, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferença significativas (p < 0,05) entre os dias para cada contaminação (n = 3). O sombreado verde representa um aumento significativo e o sombreado laranja representa uma diminuição significativa, face ao controle.

Tíóis	Raiz de espinafre – Controle				Raiz de espinafre – 25 µM Cd				Raiz de espinafre – 50 µM Cd			
	Dias				Dias				Dias			
	0	2	7	14	0	2	7	14	0	2	7	14
GSH	0,427 ± 0,046a	0,406 ± 0,030a	0,107 ± 0,009b	0,200 ± 0,039c	0,427 ± 0,046a	0,331 ± 0,039b*	0,131 ± 0,025c	0,189 ± 0,007c	0,427 ± 0,046a	0,217 ± 0,023b*	0,232 ± 0,044b*	0,117 ± 0,016c*
PC2	nd	nd	nd	nd	0,040 ± 0,007b*	0,037 ± 0,009b*	0,104 ± 0,009c*	0,120 ± 0,001c*	nd	0,067 ± 0,037b*	0,100 ± 0,018b*	0,120 ± 0,008c*
deacgly-PC2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,010 ± 0,010b*	0,060 ± 0,010d*	nd	0,008 ± 0,001b*	0,009 ± 0,001c*	0,013 ± 0,001c*
Cys-PC2	nd	nd	nd	nd	0,002 ± 0,000b*	0,020 ± 0,003c*	0,060 ± 0,010d*	0,060 ± 0,010d*	nd	0,023 ± 0,016b*	0,061 ± 0,006c*	0,083 ± 0,007d*
PC3	nd	nd	nd	nd	0,037 ± 0,003b*	0,058 ± 0,014b*	0,175 ± 0,030c*	0,060 ± 0,010d*	nd	0,071 ± 0,021b*	0,183 ± 0,024c*	0,250 ± 0,024d*
deacgly-PC3	nd	nd	nd	nd	0,026 ± 0,001b*	0,044 ± 0,008c*	0,044 ± 0,013b*	0,049 ± 0,013b*	nd	0,019 ± 0,004b*	0,035 ± 0,006c*	0,059 ± 0,010d*
PC4	nd	nd	nd	nd	nd	0,029 ± 0,003b*	0,049 ± 0,013b*	0,049 ± 0,013b*	nd	0,045 ± 0,013b*	0,063 ± 0,012b*	0,068 ± 0,014c*
PCs Totais	nd	nd	nd	nd	0,079 ± 0,008a*	0,170 ± 0,017b*	0,443 ± 0,036c*	0,443 ± 0,036c*	nd	0,233 ± 0,048a*	0,451 ± 0,034b*	0,593 ± 0,031c*

Este resultado pode de novo estar relacionado com a função da GSH como substrato para a produção de PC, isto é, com o aumento da concentração de Cd nos tecidos, aumenta a produção de PC e diminui a concentração de GSH (Bashir *et al.*, 2013). Nas raízes observa-se a produção de PC logo ao fim do dia 2 e em maiores quantidades do que nas folhas, o que mostra uma relação dose-resposta ao teor de Cd nos órgãos, existindo quantidades significativamente mais elevadas de Cd nas raízes do que nas folhas (figura 5.2 e 5.4), além de ser o órgão da planta em contacto direto com o meio contaminado. A maior produção de PC em raízes face às folhas também foi observada por outros autores em plantas de *Lycopersion esculentum* (Ammar *et al.*, 2008b), *Hordeum vulgare* (Dago *et al.*, 2014), *Cucumis sativus* (Hawrylak-Nowak *et al.*, 2014) expostas a concentrações de Cd iguais e superiores às do presente ensaio. Nas figuras 5.12d, 5.12e e 5.12f apresentam-se exemplos de cromatogramas das raízes, onde é possível identificar os vários tipos de PC analisados e na tabela 5.10 apresentam-se as estruturas simplificadas dessas PC. Em raízes expostas a 50 µM de Cd durante 14 dias foram detetadas, por ordem crescente de concentração, as seguintes PC: PC3 > PC2 > Cys-PC2 > PC4 > desGly-PC3 > desGly-PC2. Nas raízes é claro que as primeiras PC a serem produzidas foram a PC2, PC3 e Cys-PC2 (as que aparecem logo ao segundo dia de contaminação), que representam primeiras formas de fitoquelatinas a serem sintetizadas em função do stresse por Cd.

Tabela 5.10 - Estrutura de cada fitoquelatina detetada por HPLC, neste estudo (baseado em Oven *et al.*, 2002, Prasad, 2004 e Serrano *et al.*, 2015).

PCn	((Y -Glu-Cys)n-Gly)
PC2	(Y -Glu-Cys)-(Y -Glu-Cys)-(Y -Glu-Cys-Gly)
desGly-PC2	(Y -Glu-Cys)-(Y -Glu-Cys)
Cys-PC2	(Cys)-(Y -Glu-Cys)-(Y -Glu-Cys-Gly)
PC3	(Y -Glu-Cys)-(Y -Glu-Cys)-(Y -Glu-Cys)-(Y -Glu-Cys-Gly)
desGly-PC3	(Y -Glu-Cys)-(Y -Glu-Cys)-(Y -Glu-Cys)
PC4	(Y -Glu-Cys)-(Y -Glu-Cys)-(Y -Glu-Cys)-(Y -Glu-Cys)-(Y -Glu-Cys-Gly)

Najmonova *et al.* (2012) detetou PC3 > PC2 > PC4 em raízes de *Linum usitatissimum* contaminadas com Cd e Hawrylak-Nowak *et al.* (2014) detetou PC2 > PC3 > PC4 em folhas de *Cucumis sativus* contaminadas com 25 e 50 µM de Cd, resultados similares aos obtidos em *Spinacea oleracea*, no presente trabalho. Contudo, diferentes resultados podem resultar



de diferentes delineamentos experimentais com diferentes espécies, estados de desenvolvimento, concentrações de Cd e tempos de exposição.

Embora a PC2, a PC3 e a Cys-PC2 tenham sido dominantes em ambos os tecidos vegetais, o facto de, para tempos e concentrações de Cd superiores, se terem detetado outras formas (como a PC4), pode representar uma insuficiência destas na proteção das células face contaminação por Cd, existindo a necessidade da síntese de outros tipos de PC com mais locais de ligação a este metal (Clemens, 2006b; Najmanova *et al.*, 2012).

A concentração total de PC é superior em raízes face às folhas, e a sua produção foi detetada ao 2º dia de contaminação enquanto que em folhas a presença de PC apenas foi visível ao 7º dia de contaminação (tabela 5.7 e 5.8). Nesta experiência verificou-se que, tanto em folhas como em raízes, a concentração de PC aumentou com a concentração de Cd e tempo de exposição, verificando-se uma relação clara entre a contaminação por Cd e a produção de fitoquelatinas, tal como descrito por outros autores (Astolfi *et al.*, 2005; Mohamed *et al.*, 2012). No entanto, também já tem sido reportada uma redução de PC, mas normalmente em plantas (*Lycopersion esculentum*, *Spirodela polyrrhiza*) com menores níveis de desenvolvimento e concentrações entre 1 e 50 μM de Cd (Ammar *et al.*, 2008b; Seth *et al.*, 2008).

Os ácidos orgânicos (AO) podem também ligar-se aos metais e formar complexos com o Cd, transportando-o para a parte aérea e para os vacúolos das células, tanto das raízes como das folhas.

Na tabela 5.11 e 5.12 apresentam-se os resultados dos ácidos orgânicos detetados em folhas e raízes, respetivamente. Detetou-se ácido tartárico, málico, malónico e cítrico em folhas e ácido málico, malónico e cítrico em raízes. Não se conseguiu quantificar o ácido oxálico, nem em raízes nem em folhas, pois aparentemente ele sofre co-eluição com aniões inorgânicos e o seu pico parece coincidir com o primeiro pico do cromatograma, como indicado no cromatograma representado na figura 5.13. Uma situação semelhante foi também verificada por Arneloti *et al.* (2008).

A concentração total de AO em raízes aumentou com o tempo, mas não houve diferenças estatisticamente significativas entre amostras controlo e contaminadas, para cada um dos ácidos orgânicos analisados. Assim, não parece que os AO tenham um papel relevante no sistema de resposta das raízes de espinafre ao stresse induzido pelo Cd, mas também a sua síntese e as suas funções metabólicas não parecem ter sido afetadas.

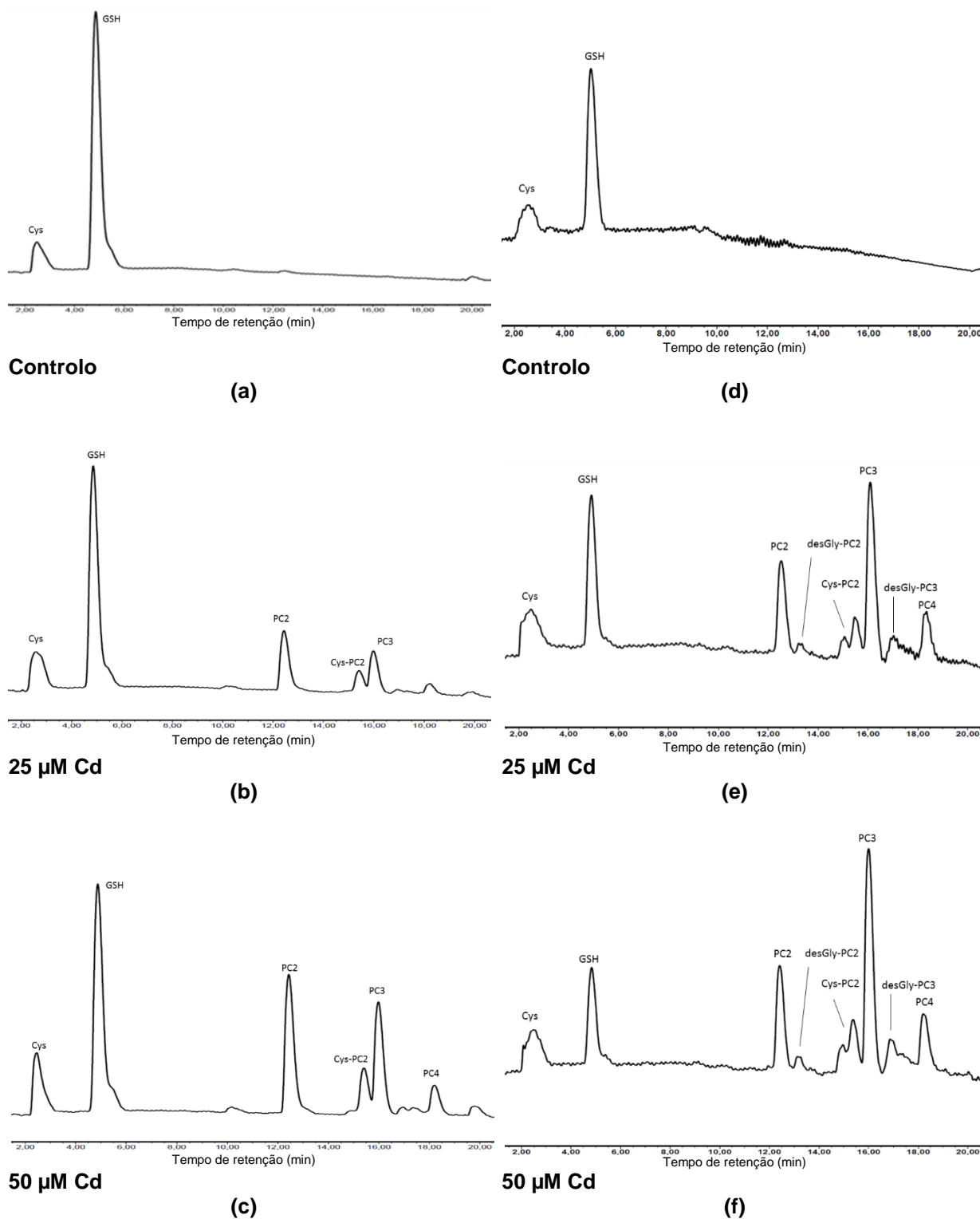


Figura 5.12 - Cromatograma de extratos de folhas controlo (a), 25 μ M (b) e 50 μ M (c) e raízes controlo (d), 25 μ M (e) e 50 μ M (f) de plantas de espinafres expostas a 0 (controlo), 25 μ M Cd e 50 μ M Cd ao 14^o dia de contaminação, com indicação dos diferentes tipos de PC detetadas.



Resultados semelhantes, como as diferenças entre plantas contaminadas e controlo pouco evidentes, têm sido descritos por outros autores (Boominathan & Doran, 2003; Wójcik *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2011), em plantas de *Thlaspi caerulescens*, *Solanum nigrum* e *Solanum melongena*.

Em folhas de plantas sujeitas a 50 μM de Cd verificou-se um aumento da concentração de todos os ácidos orgânicos detetados ao fim do 2º e do 7º dia de contaminação, em comparação com o controlo, o que pode ser considerado uma resposta ao stresse no sentido de produzir mais destes ácidos orgânicos para complexar o Cd. Ao 14º dia houve diminuição de ácido malónico e tartárico (mas não do málico e cítrico), o que pode indicar a existência de danos no metabolismo celular, ou a ativação de outros mecanismos de resposta complementares. Nas plantas sujeitas a 25 μM de Cd os efeitos foram semelhantes mas menos acentuados, pois os teores de ácido tartárico e málico só diferiram do controlo a partir do dia 7. As alterações no perfil de AO podem indicar uma forte coordenação nas estratégias globais de resposta ao stresse oxidativo, sugerindo que a primeira etapa dos mecanismos de defesa pode ser assegurada pelos AO; contudo para condições de stresse mais intensas outras estratégias podem-se tornar mais relevantes, como a síntese de PC. Esta hipótese é suportada por Choppala *et al.* (2014), que refere que o Cd forma complexos com aminoácidos e com aniões de ácidos orgânicos (por exemplo, ácidos cítrico, oxálico, málico), constituindo um mecanismo celular relacionado com a tolerância à toxicidade de cádmio. Os ácidos orgânicos formados podem ser transportados para os vacúolos onde são acumulados.

O aumento de ácido málico pode ser justificado pela regulação da entrada de acetil-coA no ciclo de Krebs. A regulação pelo ácido cítrico pode causar a acumulação de ácido pirúvico e a ativação da piruvato-carboxilase, transformando o ácido pirúvico em ácido oxaloacético. Consequentemente o ácido oxaloacético pode ser convertido em ácido málico através de reações do ciclo de Krebs, como foi referido no ponto 5.1 (Taiz & Zeiger, 2002). Não tendo os teores de ácido cítrico e málico (ambos intervenientes do ciclo de Krebs) sido reduzidos com o tempo ou com o teor de Cd, tanto em folhas como em raízes, pode-se concluir que esta parte do metabolismo primário das plantas de espinafre não está a ser afetado, ajudando a explicar a elevada tolerância da planta ao Cd. Estes resultados indicam a possibilidade de existir uma correlação entre a toxicidade de cádmio e efeitos diretos e indiretos no metabolismo primário das plantas, caso estas não disponham de mecanismos de defesa eficientes, podendo causar não só a inibição de algumas enzimas, como causar perturbações nas vias metabólicas, que podem levar a variações nas concentrações de ácidos orgânicos, ácidos cítrico, oxálico, málico, succínico.



Tabela 5.11 – Concentração de ácidos orgânicos ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) em folhas de plantas de espinafre adultas, expostas a 0 (controle), 25 μM Cd and 50 μM Cd durante 14 dias.

O símbolo \pm representa o desvio padrão. O asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle e as plantas contaminadas, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada contaminação ($n = 3$). O sombreado verde representa um aumento significativo e o sombreado laranja representa uma diminuição significativa, face ao controle.

AO	Folhas de espinafre- Controle					Folhas de espinafre – 25 μM Cd					Folhas de espinafre- 50 μM Cd				
	Dias					Dias					Dias				
	0	2	7	14		0	2	7	14		0	2	7	14	
Tartárico	0,111 \pm 0,005a	0,074 \pm 0,008b	0,074 \pm 0,019b	0,129 \pm 0,020a		0,111 \pm 0,005a	0,085 \pm 0,001b	0,103 \pm 0,009a*	0,084 \pm 0,003b*		0,111 \pm 0,005a	0,133 \pm 0,003b*	0,117 \pm 0,002a*	0,056 \pm 0,037c*	
Málico	0,015 \pm 0,002a	0,009 \pm 0,002a	0,008 \pm 0,002a	0,019 \pm 0,005a		0,015 \pm 0,002a	0,010 \pm 0,002a	0,013 \pm 0,002a*	0,018 \pm 0,004a		0,015 \pm 0,002a	0,028 \pm 0,006a*	0,045 \pm 0,007a*	0,039 \pm 0,005a*	
Malónico	0,052 \pm 0,011a	0,225 \pm 0,009a	0,149 \pm 0,031b	0,347 \pm 0,011c		0,052 \pm 0,011a	0,279 \pm 0,008b*	0,206 \pm 0,016c*	0,207 \pm 0,020c*		0,052 \pm 0,011a	0,284 \pm 0,027a*	0,230 \pm 0,018bc*	0,163 \pm 0,017c*	
Cítrico	0,055 \pm 0,002a	0,052 \pm 0,007a	0,060 \pm 0,010ab	0,077 \pm 0,003b		0,055 \pm 0,002a	0,062 \pm 0,002a*	0,117 \pm 0,001b*	0,093 \pm 0,024b		0,055 \pm 0,002a	0,067 \pm 0,008ac*	0,106 \pm 0,011b*	0,081 \pm 0,021bc	
Total	0,433 \pm 0,013	0,360 \pm 0,014	0,290 \pm 0,038	0,573 \pm 0,024		0,433 \pm 0,013	0,436 \pm 0,009a*	0,439 \pm 0,019a*	0,403 \pm 0,031b*		0,433 \pm 0,013	0,512 \pm 0,029a*	0,498 \pm 0,022a*	0,339 \pm 0,047b*	

Tabela 5.12 – Concentração de ácidos orgânicos ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) em raiz de plantas espinafre adultas, expostas a 0 (controle), 25 μM Cd and 50 μM Cd durante 14 dias.

O símbolo \pm representa o desvio padrão. O asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle e as plantas contaminadas, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada contaminação ($n = 3$).

AO	Raiz de espinafre- Controle					Raiz de espinafre – 25 μM Cd					Raiz de espinafre- 50 μM Cd				
	Dias					Dias					Dias				
	0	2	7	14		0	2	7	14		0	2	7	14	
Málico	0,0028 \pm 0,0011a	0,0041 \pm 0,0005	0,0030 \pm 0,0001a	0,0030 \pm 0,0005		0,0028 \pm 0,0011a	0,0041 \pm 0,0009a	0,0025 \pm 0,0001a*	0,0036 \pm 0,0003		0,0028 \pm 0,0011a	0,0029 \pm 0,0009a*	0,0035 \pm 0,0005a	0,0032 \pm 0,0002	
Malónico	0,0031 \pm 0,0003a	0,0018 \pm 0,0006	0,0024 \pm 0,0004a	0,0276 \pm 0,0032		0,0031 \pm 0,0003a	0,0021 \pm 0,0001a	0,0029 \pm 0,0001a	0,0311 \pm 0,0133		0,0031 \pm 0,0003a	0,0019 \pm 0,0004b	0,0017 \pm 0,0002b	0,0357 \pm 0,0159	
Cítrico	0,0076 \pm 0,0005a	0,0072 \pm 0,0004	0,0110 \pm 0,0016b	0,0097 \pm 0,0002		0,0076 \pm 0,0005a	0,0082 \pm 0,0014a	0,0061 \pm 0,0001b	0,0094 \pm 0,0005		0,0076 \pm 0,0005a	0,0056 \pm 0,0008a	0,0076 \pm 0,0001a	0,0085 \pm 0,0016	
Total	0,0135 \pm 0,0013	0,0131 \pm 0,0009	0,0164 \pm 0,0017	0,0406 \pm 0,0032		0,0135 \pm 0,0013	0,0144 \pm 0,0017a	0,0116 \pm 0,0002b*	0,0440 \pm 0,0133		0,0135 \pm 0,0013	0,0104 \pm 0,0011a*	0,0129 \pm 0,0016a	0,0474 \pm 0,016b*	

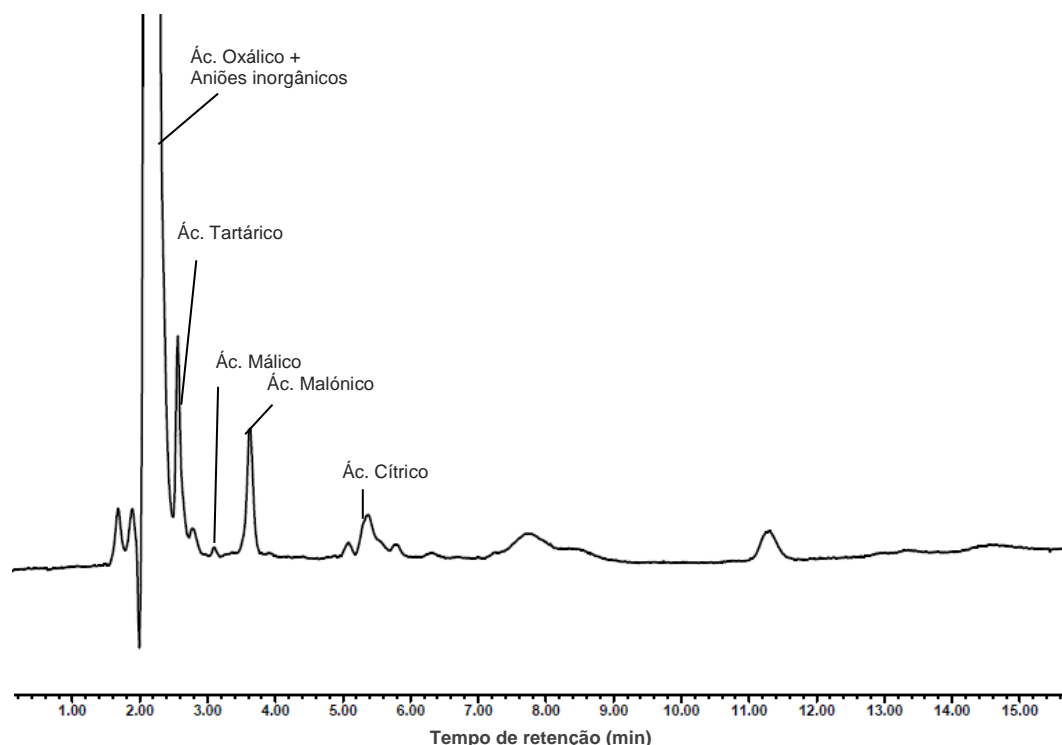


Figura 5.13 - Cromatograma de extratos de folhas de plantas de espinafres expostas a 50 μM Cd ao 14º dia de contaminação, com os diferentes ácidos orgânicos identificados.

Nas tabelas 5.13 e 5.14 resumem-se os resultados obtidos neste capítulo para as plantas adultas e jovens, respetivamente, através de correlações entre os parâmetros estudados. Em plantas adultas, confirma-se pela tabela 5.13, que existem correlação elevadas e positivas entre a concentração de Cd e de PC, para raízes e folhas, significando que um aumento da concentração de Cd está associado ao aumento da produção de fitoquelatinas. Em relação aos AO as correlações são mais díspares devido à variação do seu teor com o tempo, por exemplo, a correlação negativa em folhas deve-se ao facto de ao 14 dia a concentração de AO totais ter diminuído em folhas de plantas contaminadas.

A clorofila e os carotenoides totais apresentam uma elevada correlação positiva, a diminuição da concentração de ambas apresenta o mesmo comportamento ao longo do tempo, provavelmente devido ao seu papel paralelo no processo de fotossíntese, onde os carotenoides atuam como protetores. Por outro lado a correlação entre a concentração de Cd em folhas e carotenoides totais é baixa, podendo-se dever à falta de linearidade de comportamento e por isso a correlação de Pearson não é muito indicativa. Contudo a Ant e a Zea apresentam correlações médias negativas, demonstrando que o aumento de Cd nos órgãos leva à diminuição destes carotenoides, provavelmente pela sua oxidação. A

concentração de Ant também se correlaciona fortemente com a concentração de H_2O_2 em folhas (-0,80), o aumento da concentração deste composto leva à diminuição de Anteroxantina. A concentração de H_2O_2 também se correlaciona fortemente com a concentração de fitoquelatinas, comprovando o stresse oxidativo provocado pelo Cd no órgão, induzindo também a produção de PC.

Tabela 5.13 - Coeficientes de correlação de Pearson entre a concentração de Cd nos tecidos e parâmetros indicadores da extensão de stresse oxidativo, e o sistema antioxidante não enzimático, ao longo do tempo para plantas adultas.

Plantas Adultas	Cd		Clorofila		MDA		H_2O_2	
	25 μM	50 μM	25 μM	50 μM	25 μM	50 μM	25 μM	50 μM
Car. Total	0,02	-0,48	0,97	0,95	0,19	-0,07	0,46	0,19
α Car	0,03	-0,28	-0,99	-0,46	-0,16	-0,43	-0,46	-0,60
β Car	-0,04	-0,46	0,92	0,97	0,23	0,04	0,60	0,24
Neo	-0,05	-0,32	1,00	0,99	0,17	0,16	0,50	0,39
Lut	0,29	-0,16	0,92	0,97	0,48	0,32	0,74	0,54
Vio	-0,26	-0,63	0,99	-0,01	-0,06	-0,78	0,28	-0,68
Ant	-0,64	-0,76	0,00	0,02	-0,76	-0,89	-0,80	-0,80
Zea	-0,67	-0,40	0,10	0,58	-0,77	-0,25	-0,76	-0,03
AsA folhas	-0,67	0,13	-0,56	-0,89	-0,71	-0,27	-0,71	-0,50
PC folhas Total	0,99	1,00	-0,08	-0,37	0,94	0,87	0,74	0,76
PC raízes Total	0,79	0,83	0,05	-0,03	-0,89	-0,45	0,30	-0,59
Ác. Tartárico folhas	-0,57	-0,93	0,79	0,40	-0,46	-0,74	-0,18	-0,65
Ác. Málico folhas	0,67	0,58	0,22	0,32	0,59	0,87	0,44	0,85
Ác. Malónico folhas	-0,75	-0,94	-0,58	0,16	-0,86	-0,88	-0,92	-0,84
Ác. Cítrico folhas	0,61	0,35	0,54	0,60	0,81	0,76	0,97	0,82
AO folhas Totais	-0,85	-0,81	0,37	0,50	-0,68	-0,53	-0,35	-0,45
Ác. Málico raiz	0,39	0,65	-0,98	0,58	0,48	-0,76	-0,83	-0,97
Ác. Malónico raiz	0,62	0,60	-0,31	-0,57	-0,62	0,00	-0,18	0,02
Ác. Cítrico raiz	0,32	0,16	-0,81	0,13	0,05	-0,68	-0,78	-0,34
AO raízes Totais	0,62	0,59	-0,40	-0,52	-0,55	-0,06	-0,27	-0,02

Em plantas jovens verifica-se uma correlação média e negativa entre os carotenoides e Cd em folhas para 25 μM de Cd e baixa para 50 μM de Cd. Contudo a Ant, também nestas plantas, apresentou elevada correlação negativa com a concentração de Cd (-0,89) para 25 μM e média (-0,75) para 50 μM . A Zea apresentou uma correlação elevada de -0,90, para 25 μM de Cd. A correlação entre carotenoides e clorofilas foi também elevada e positiva, justificando do



mesmo modo com papel protetor dos carotenoides. O AsA em folhas de plantas jovens também se correlacionou fortemente com a presença de Cd, demonstrando o seu possível efeito antioxidante.

Quaisquer correlações baixas ou inexistentes podem estar relacionadas com o facto de a um comportamento nem sempre se aplicar uma relação linear como na correlação de Pearson.

Tabela 5.14 - Coeficientes de correlação de Pearson entre a concentração de Cd nos tecidos e parâmetros indicadores da extensão de stresse oxidativo, e o sistema antioxidante não enzimático, ao longo do tempo para plantas jovens.

Plantas Jovens	Cd		Clorofila Total		MDA		H ₂ O ₂	
	25 µM	50 µM	25 µM	50 µM	25 µM	50 µM	25 µM	50 µM
Car. Totais	-0,69	0,02	1,00	0,84	-0,71	0,46	-0,66	-0,43
α Car	0,69	0,93	-0,21	-0,48	0,86	0,77	-0,48	0,92
β Car	-0,68	0,49	0,99	-0,39	-0,75	0,00	-0,55	0,37
Neo	-0,61	0,09	0,99	0,95	-0,58	0,43	-0,78	-0,52
Lut	-0,41	0,20	0,95	0,94	-0,51	0,45	-0,64	-0,49
Vio	-0,57	0,20	0,99	0,76	-0,61	0,62	-0,68	-0,25
Ant	-0,89	-0,75	0,24	-0,31	-0,76	-0,56	0,08	-0,14
Zea	-0,90	-0,45	0,30	-0,78	-0,68	-0,51	-0,13	0,30
AsA folhas	0,85	0,97	-0,79	-0,11	0,98	0,95	0,12	0,72

5.3.6. Sistema Antioxidante Enzimático

Como foi referido anteriormente, o sistema antioxidante enzimático é responsável pelo controlo do balanço entre a produção e a eliminação de ROS, e consequentemente pelo controlo do stresse oxidativo, neste caso induzido pelo Cd. No entanto, o sistema antioxidante enzimático atua de forma concertada com o sistema antioxidante não enzimático, envolvendo nomeadamente o AsC e a GSH, e encontra-se integrado numa resposta global que permite às plantas um eficaz sistema de defesa antioxidante. Os resultados obtidos confirmam esta estreita ligação entre mecanismos enzimáticos e não enzimáticos.

Na figura 5.14 apresentam-se os resultados da atividade enzimática da CAT em plantas jovens. Em plantas jovens, a atividade enzimática da CAT em folhas foi superior no 7º e 14º dia de ensaio para plantas expostas a 50 µM de Cd em relação ao controlo; em raízes, para os mesmos dias, a sua atividade foi significativamente superior em plantas contaminadas. Em

plantas adultas, verificou-se que a atividade da CAT em folhas também tende a aumentar com a exposição a 50 μM de Cd, sendo significativamente superior em relação ao controle, em raízes a atividade da CAT aumenta significativamente com a concentração de Cd ao 14º dia.

Os níveis de atividade da CAT em folhas são muito mais elevados em plantas jovens que em adultas. Os valores de atividade da CAT bastante superiores em amostras de folhas de plantas jovens coincidem com os valores de H_2O_2 mais baixos obtidos em folhas jovens, evidenciando a atividade da CAT, assegurando uma eficaz remoção do excesso de H_2O_2 resultante do efeito tóxico. Roychoudhury *et al.* (2012) em *Oryza sativa* e Nouairi *et al.* (2009) em *Brassica juncea*, também observaram o aumento da atividade da CAT com o aumento da concentração de Cd, enquanto que noutras espécies como *Brassica napus* se verifica o oposto (Benavides *et al.*, 2005; Nouairi *et al.*, 2009), o que indica que a resposta da CAT não é idêntica em todas as plantas. Em alguns trabalhos realizados com a resposta da planta de tabaco ao efeito tóxico do Cd (Martins *et al.*, 2010) verifica-se que não há evidência de um papel relevante da CAT no mecanismo de defesa em relação ao stresse, apesar do tabaco ser uma planta tolerante ao Cd.

A CAT é uma enzima referida como tendo uma afinidade mais baixa para o H_2O_2 comparando com a APX, por exemplo, o que indica que atua principalmente em situações em que as concentrações de H_2O_2 são elevadas (Mittler, 2002). Para além disso, é uma enzima com uma localização celular mais confinada a alguns compartimentos celulares, como os peroxissomas pelo que o seu papel na remoção de ROS pode ser menos eficaz. Em alguns trabalhos realizados com a resposta da planta de tabaco ao efeito tóxico do Cd (Martins *et al.*, 2010) verifica-se que não há evidência de um papel relevante da CAT no mecanismo de defesa em relação ao stresse, apesar do tabaco ser uma planta tolerante ao Cd.

A atividade da GPOD, também responsável pela eliminação de H_2O_2 , aumenta significativamente com o aumento da concentração de Cd, tanto em folhas de plantas jovens como de plantas adultas, como se pode ver pela figura 5.15. Em raízes, a GPOD também apresenta tendência para aumentar com o aumento da concentração de Cd na solução nutritiva. Estes resultados indicam que, tal como a CAT, também a GPOD aumentou a atividade pelo que é uma enzima ativa na remoção do excesso de H_2O_2 produzido em condições de stresse induzido pelo Cd. Pela análise da figura 5.6 é possível confirmar que as concentrações de H_2O_2 entre o dia 7 e 14 em folhas de plantas contaminadas se mantêm controladas, e há uma diminuição da concentração de H_2O_2 em raiz ao dia 7 para 50 μM de Cd e ao dia 14 para ambas as modalidades de contaminação. Estes resultados tornam possível reforçar o papel importante tanto da CAT como das restantes peroxidases nos



mecanismos de tolerância ao stresse, através da manutenção das concentrações de H_2O_2 , e consequentemente de ROS, e desta forma diminuir os danos de natureza oxidativa que estes provocam.

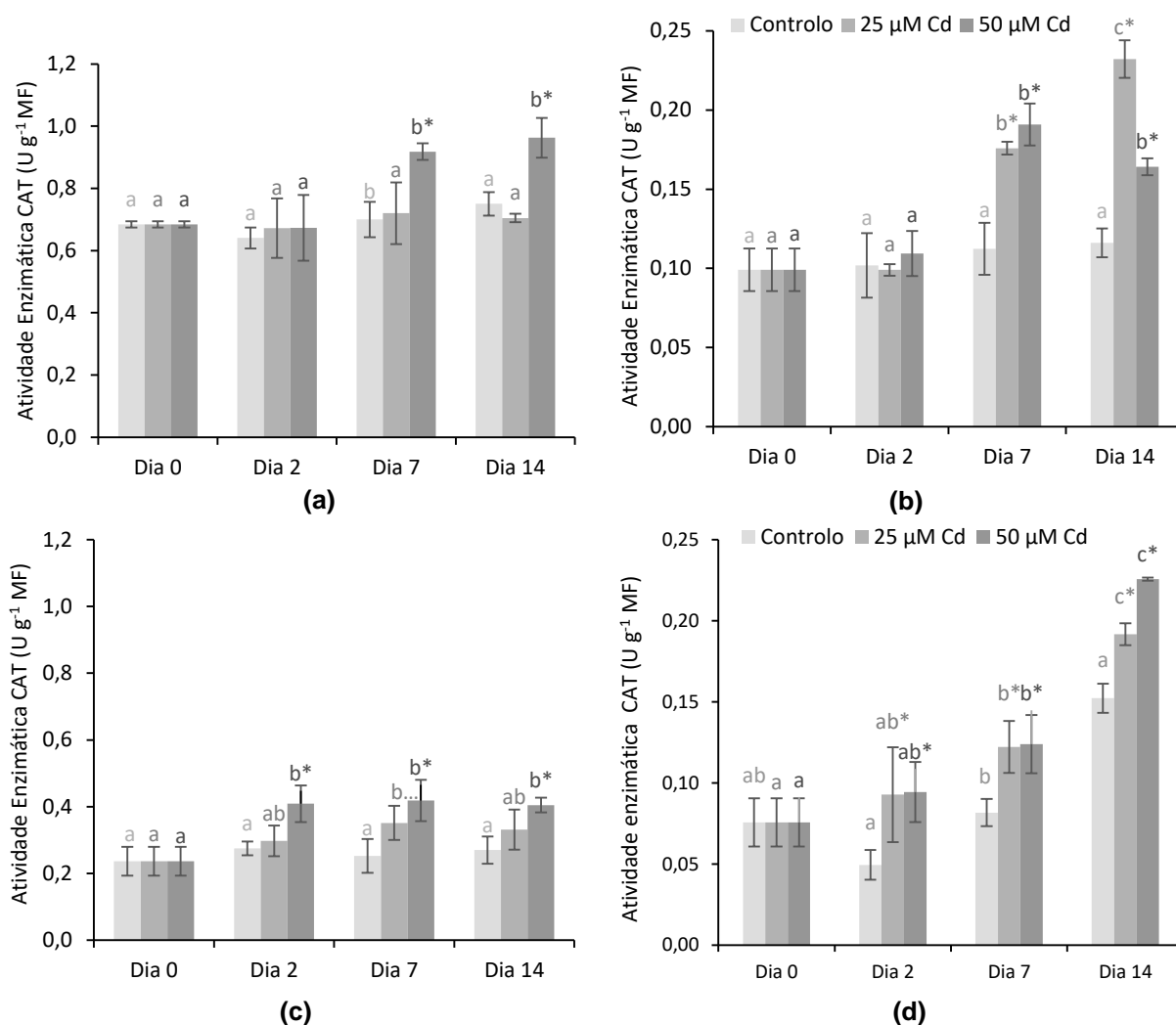


Figura 5.14 - Atividade enzimática da CAT (U g^{-1} MF) em folhas e raízes de plantas de espinafre. Plantas jovens: (a) folhas e (b) raízes. Plantas adultas: (c) folhas e (d) raízes, sem Cd (controle) e com $25 \mu\text{M}$ Cd e $50 \mu\text{M}$ Cd na solução nutritiva.

As barras de erro representam o desvio padrão, o asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle e as plantas contaminadas, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferença significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada contaminação ($n = 3$).

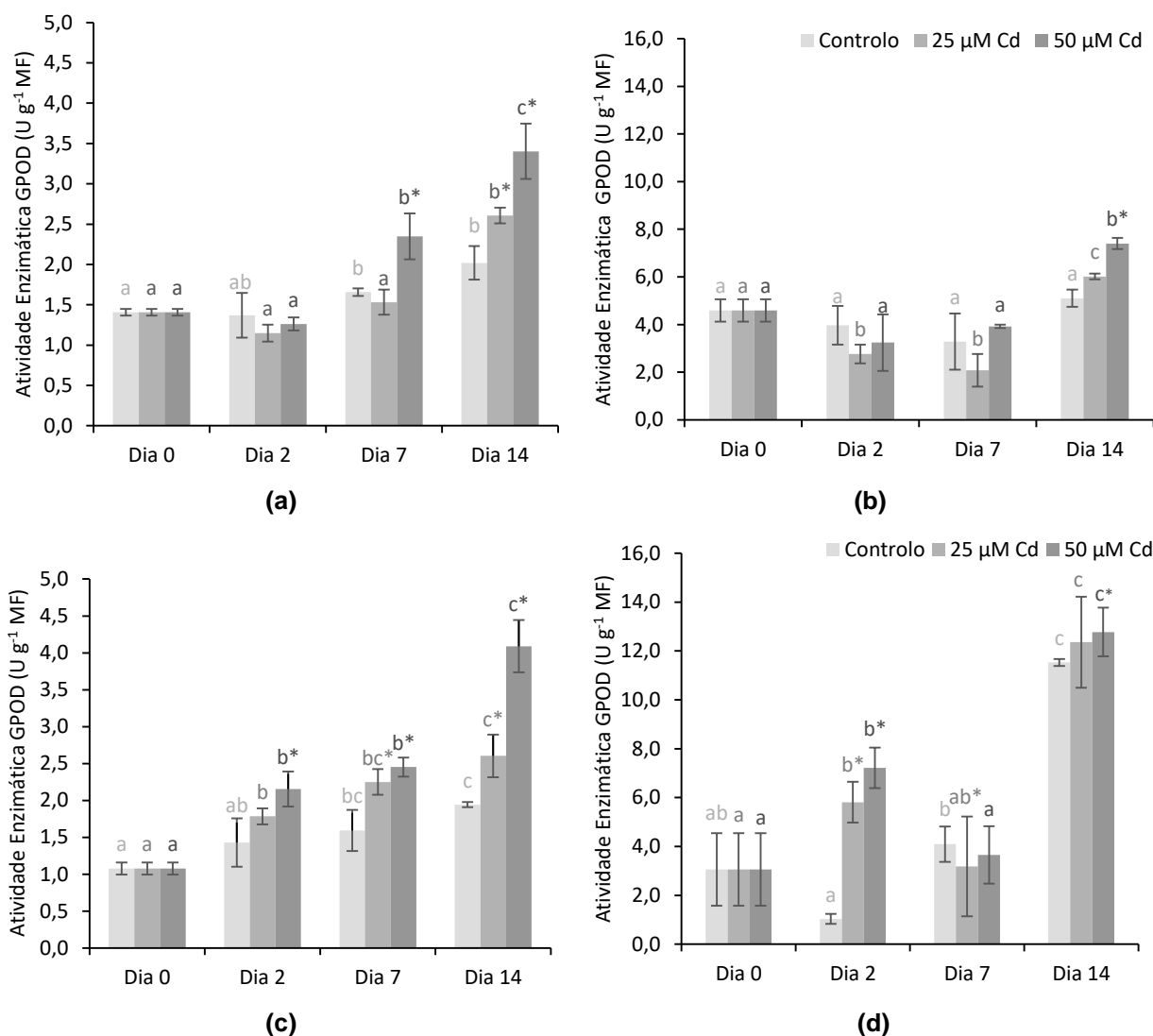


Figura 5.15 - Atividade enzimática da GPOD (U g⁻¹ MF) em folhas e raízes de plantas de espinafre. Plantas jovens: (a) folhas e (b) raízes. Plantas adultas: (c) folhas e (d) raízes, sem Cd (controle) e com 25 μM Cd e 50 μM Cd na solução nutritiva.

As barras de erro representam o desvio padrão, o asterisco indica diferenças significativas (p < 0,05) entre o controle e as plantas contaminadas, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferença significativas (p < 0,05) entre os dias para cada contaminação (n = 3).

Em folhas de plantas adultas a atividade da APX (figura 5.16) aumenta quando expostas a 50 μM de Cd em comparação com o controle, enquanto que em folhas de plantas jovens este aumento de atividade é menos evidente, e verifica-se apenas ao dia 14. Também em raiz de plantas de espinafre, a atividade da APX, não mostra ser influenciada pelo efeito tóxico do Cd, provavelmente porque a CAT e a GPOD conseguem garantir de forma eficiente a eliminação de H₂O₂. Tal como já referido, a APX é eficiente na remoção de H₂O₂ quando as concentrações são baixas e a atividade da CAT ocorre quando essas concentrações são altas



(Mittler, 2002), pelo que os níveis mais elevados de H_2O_2 na presença de Cd, podem ser a justificação para este comportamento. Vários autores também descrevem o aumento da atividade da APX, em plantas de *Solanum lycopersicum* (Benavides *et al.*, 2005), *Pisum sativum* (DalCorso *et al.*, 2008) e *Atriplex halimus* (Lefèvre *et al.*, 2010) contaminadas com Cd.

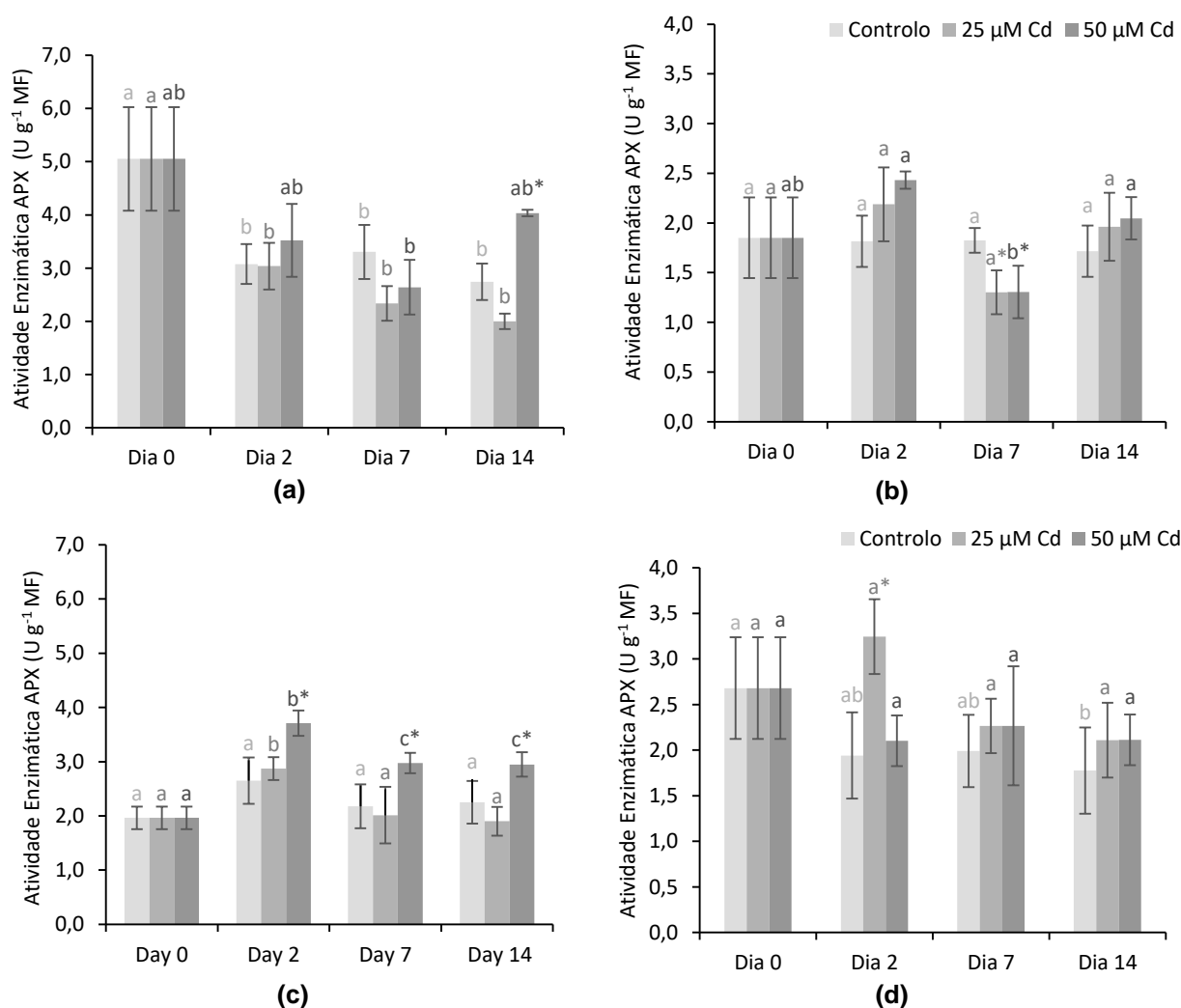


Figura 5.16 - Atividade enzimática da APX (U g⁻¹ MF) em folhas e raízes de plantas de espinafre. Plantas jovens: (a) folhas e (b) raízes. Plantas adultas: (c) folhas e (d) raízes, sem Cd (controle) e com 25 μM Cd e 50 μM Cd na solução nutritiva.

As barras de erro representam o desvio padrão, o asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle e as plantas contaminadas, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferença significativas ($p < 0,05$) entre os dias para cada contaminação ($n = 3$).



Os resultados de ascorbato (figura 5.9) são concordantes com os resultados da atividade da APX. Em plantas jovens, o aumento significativo da atividade da APX que se verifica em plantas expostas a 50 μM durante 14 dias, coincide com o aumento significativo da concentração de AsA, necessário à atividade desta enzima. Em plantas adultas, a concentração de AsA também foi superior em plantas contaminadas tal como a atividade da APX. Como substrato da enzima, os níveis de AsA acompanham a atividade desta enzima. A atividade da SOD (figura 5.17) não apresenta diferenças significativas na maior parte dos resultados obtidos, tanto em relação a parte da planta (folhas e raízes) como a fase de desenvolvimento (plantas jovens e adultas). A única exceção a este resultado refere-se a raízes de plantas jovens, em que há uma diminuição significativa da atividade da SOD com o tempo, mas que não parece estar relacionada com a presença de Cd na solução nutritiva e sim com o estado de desenvolvimento da planta, uma vez que não se verificam diferenças significativas entre o controlo e as plantas contaminadas para um mesmo tempo de desenvolvimento (figura 5.17b).

A atividade da SOD tem sido descrita por outros autores em *Triticum aestivum* exposta a 33 mg Cd kg^{-1} , *Lycopersicon esculentum* exposta a 10 μM Cd (DalCorso *et al.*, 2008), e *Atriplex halimus* exposta a 100 μM Cd (Lefèvre *et al.*, 2010), que verificam que há um papel ativo desta enzima nos mecanismos de defesa. Contudo, os resultados obtidos neste trabalho para esta enzima, para todas as situações estudadas, não indicam uma tendência de variação bem definida, ao longo do tempo nem com a concentração de Cd na solução nutritiva, o que parece indicar que a SOD existente consegue controlar os níveis de $\text{O}_2^{\bullet-}$ no meio celular mesmo em situações de stresse, e que esta não é uma forma de ROS que tenha tendência a uma acumulação nesta planta. Como foi anteriormente referido, uma possibilidade é ocorrer a conversão de $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , e este ser posteriormente eliminado pela CAT e restantes peroxidases.

Em folhas de plantas adultas a atividade da GR aumenta significativamente na presença de Cd, mas este comportamento já não se verifica em raízes (figura 5.18). Em folhas de plantas jovens há uma tendência para o aumento da atividade da GR embora não se tenham obtido diferenças estatisticamente significativas. Por outro lado, em raízes de plantas jovens, verifica-se um aumento significativo da atividade quando expostas a 50 μM de Cd.

O aumento da atividade da GR é muitas vezes associado à produção de GSH, que pode ser substrato da GPX na eliminação de H_2O_2 , ou como substrato para a produção de PC. Contudo a concentração de GSH em plantas adultas não aumenta com a concentração de Cd nem ao longo do tempo, e apesar de ser produzida em plantas contaminadas é provavelmente



consumida para produção de PC e/ou pela GPX. O aumento significativo da atividade da GR em raízes de plantas jovens e em folhas de plantas adultas indica um papel muito importante desta enzima na regeneração da GSH pela redução da GSSG, e desta forma assegurar os níveis de GSH necessários à síntese de PC. Também aqui é evidente uma forte coordenação entre os mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, assegurando a formação de PC que, tal como se verificou no ponto 5.3.5. é um processo absolutamente crucial para a tolerância destas plantas ao Cd.

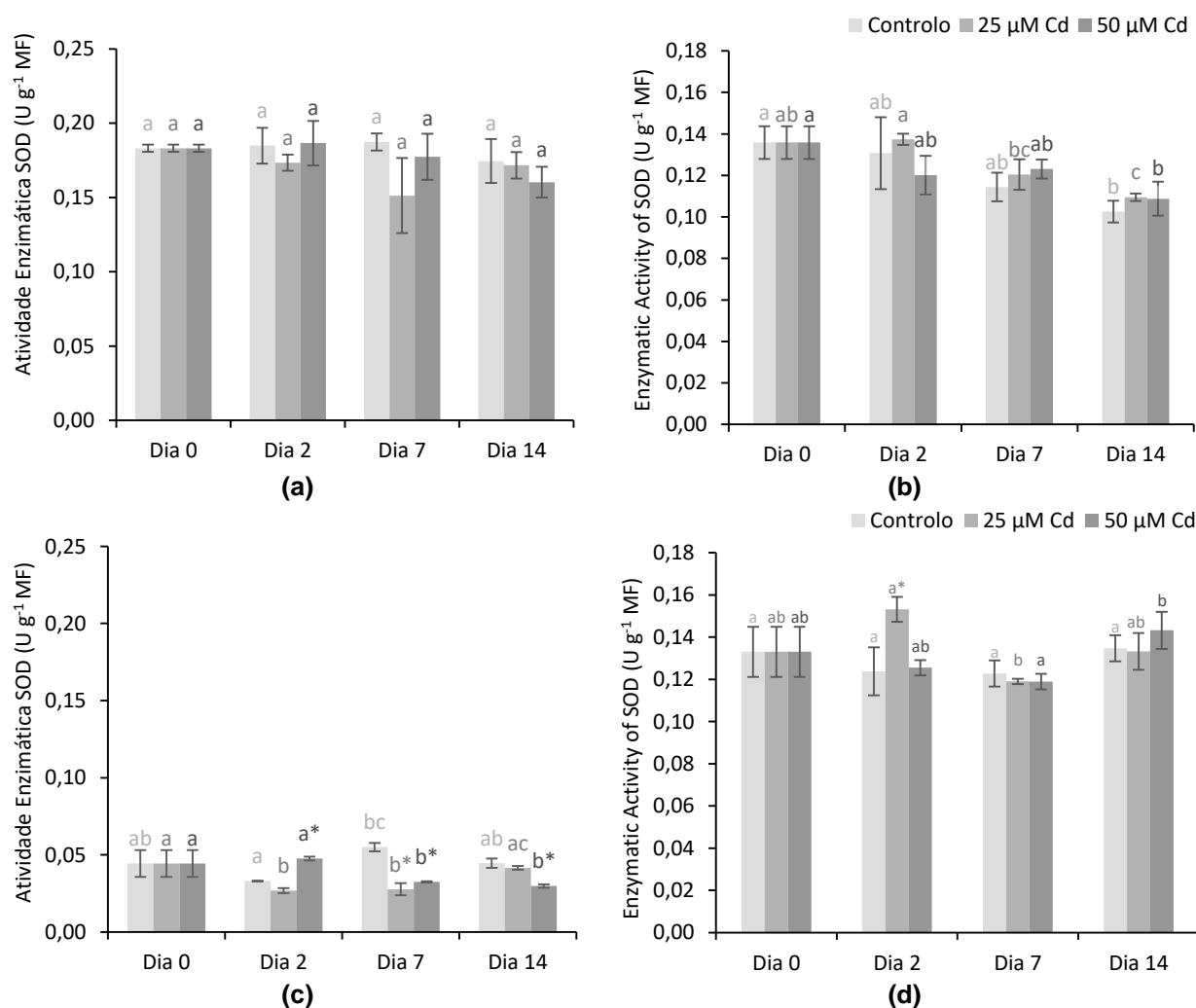


Figura 5.17 - Atividade enzimática da SOD (U g⁻¹ MF) em folhas e raízes de plantas de espinafre. Plantas jovens: (a) folhas e (b) raízes. Plantas adultas: (c) folhas e (d) raízes, sem Cd (controlo) e com 25 µM Cd e 50 µM Cd na solução nutritiva.

As barras de erro representam o desvio padrão, o asterisco indica diferenças significativas (p < 0,05) entre o controlo e as plantas contaminadas, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferença significativas (p < 0,05) entre os dias para cada contaminação (n = 3).



Em *Pisum sativum* (Benavides *et al.*, 2005) e *Atriplex halimus* exposta a 100 μM de Cd (Lefèvre *et al.*, 2010), a atividade da GR também aumentou, enquanto que Yannarelli *et al.* (2007) descreve um comportamento diferente entre folhas e raízes de *Triticum aestivum*, verificando-se um aumento da atividade da GR em raízes expostas a 100 μM de Cd e não se verificando diferenças em folhas.

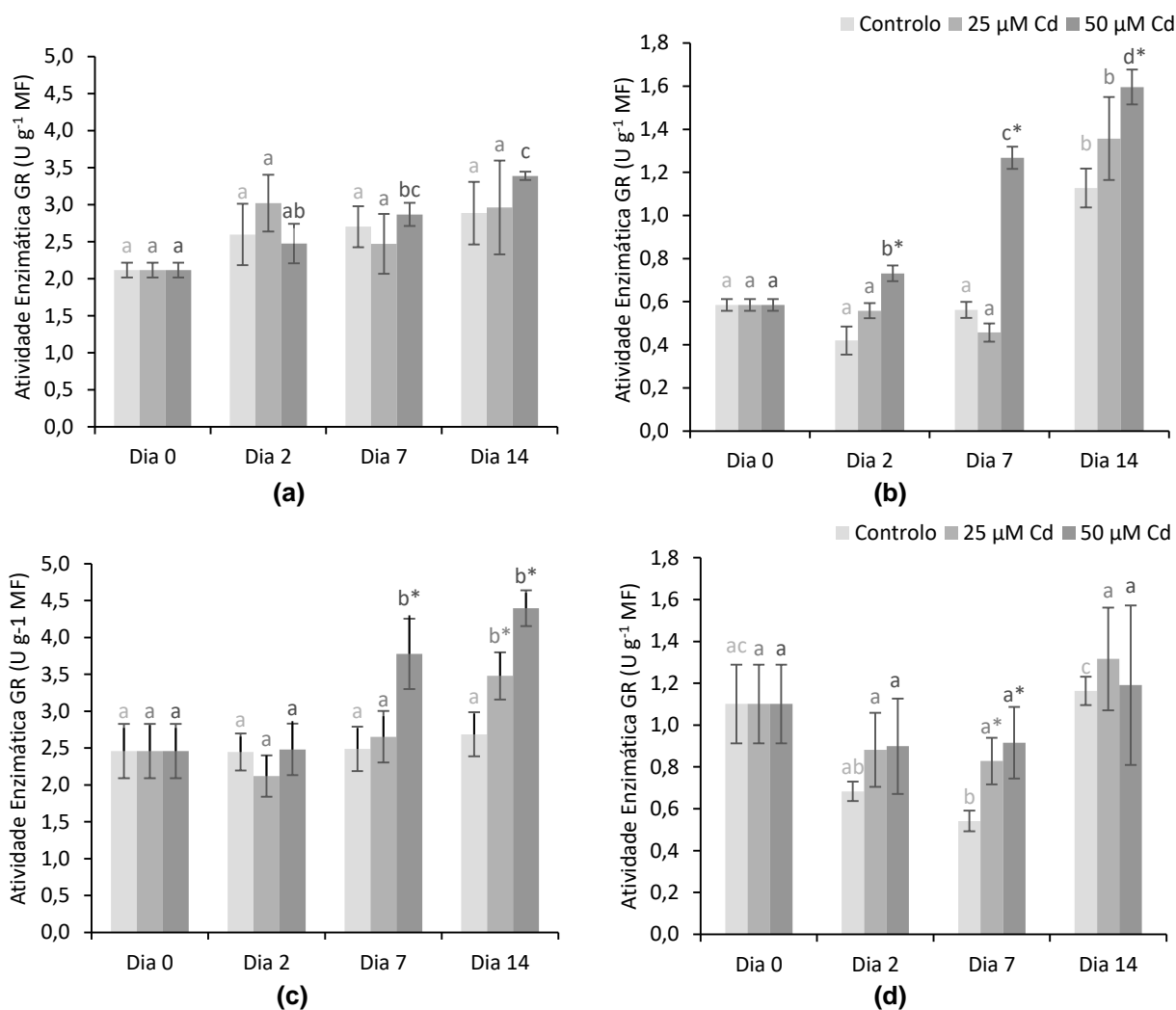


Figura 5.18 - Atividade enzimática da GR (U g⁻¹ MF) em folhas e raízes de plantas de espinafre. Plantas jovens: (a) folhas e (b) raízes. Plantas adultas: (c) folhas e (d) raízes, sem Cd (controlo) e com 25 μM Cd e 50 μM Cd na solução nutritiva.

As barras de erro representam o desvio padrão, o asterisco indica diferenças significativas (p < 0,05) entre o controlo e as plantas contaminadas, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferença significativas (p < 0,05) entre os dias para cada contaminação (n = 3).



Pelos gráficos da figura 5.19, não se verificam diferenças da atividade da GPX nem em função da concentração de Cd nem ao longo do tempo, sugerindo que os níveis de atividade da GPX não são influenciados pelo stresse oxidativo produzido pelo Cd, com exceção do dia 2 em raízes de plantas jovens.

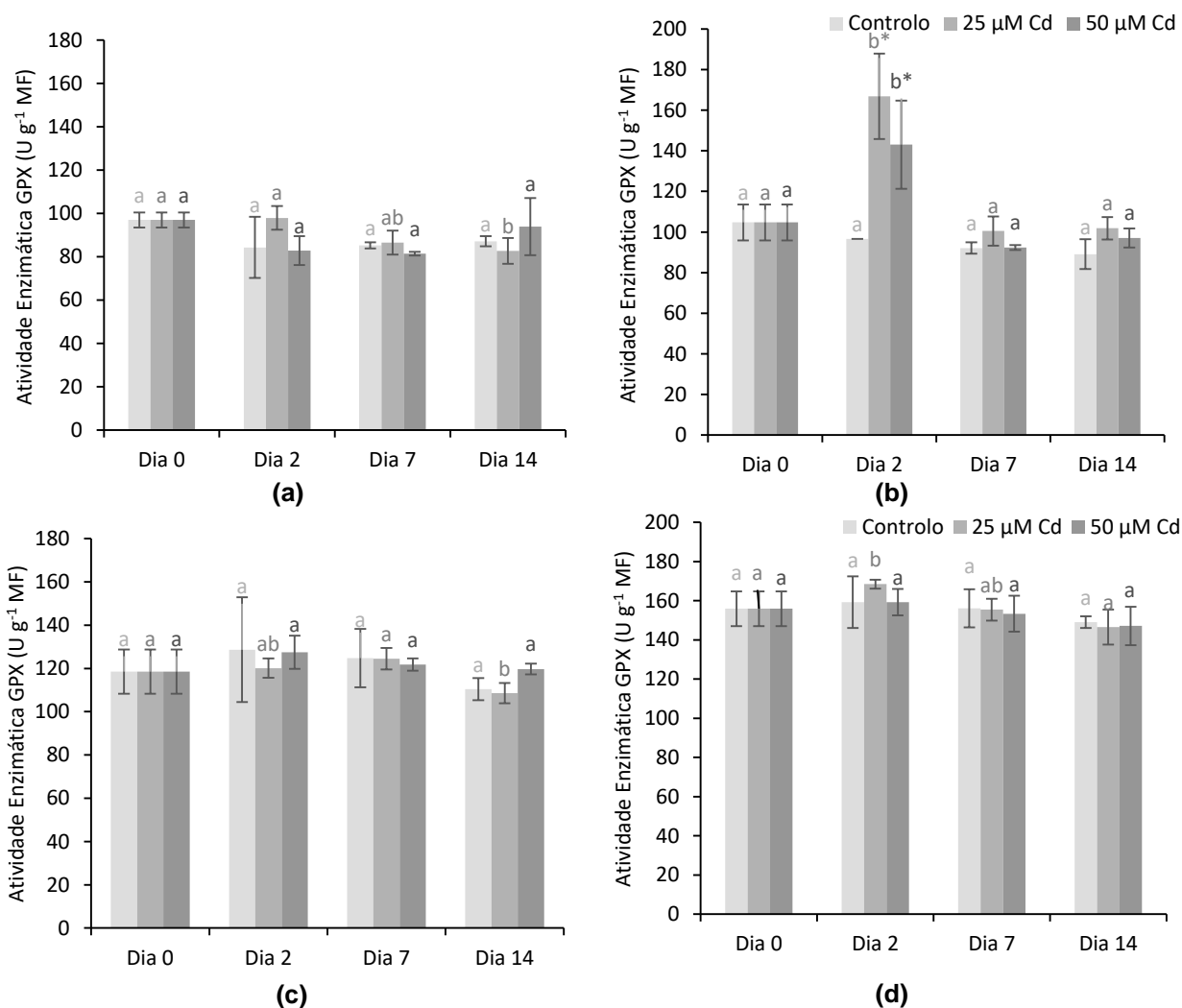


Figura 5.19 - Atividade enzimática da GPX (U g⁻¹ MF) em folhas e raízes de plantas de espinafre. Plantas jovens: (a) folhas e (b) raízes. Plantas adultas: (c) folhas e (d) raízes, sem Cd (controlo) e com 25 µM Cd e 50 µM Cd na solução nutritiva.

As barras de erro representam o desvio padrão, o asterisco indica diferenças significativas (p < 0,05) entre o controlo e as plantas contaminadas, para cada dia. Diferentes letras minúsculas representam diferença significativas (p < 0,05) entre os dias para cada contaminação (n = 3).



A atividade da GPX envolve a utilização de H_2O_2 e GSH como substratos e a atividade da GR permite obter glutathione reduzida que é utilizada como substrato da GPX para degradação de H_2O_2 . Contudo, os resultados obtidos indicam um papel pouco relevante (e redundante) da enzima GPX na resposta antioxidante desta planta: por um lado, a remoção do H_2O_2 é assegurada através da ativação da CAT e das peroxidases, enquanto que a GSH é preferencialmente utilizada para a síntese de PC, não estando disponível como substrato para a GPX. Esta possibilidade está de acordo com o verificado para a GR, CAT e GPOD, reforçando o papel importante das PC no mecanismo de tolerância ao Cd (Clemens, 2006b; Wood & Feldmann, 2012; Fernández *et al.*, 2013a; Choppala *et al.*, 2014).

Roychoudhury *et al.* (2012) refere um aumento da atividade da GPX em *Oryza sativa* com 12 dias de crescimento e 2 dias de contaminação com Cd, acompanhado de um comportamento pouco evidente da CAT, e também no caso desta enzima podemos verificar que a resposta enzimática é variável de planta para planta.

Na planta de espinafre atuam claramente a GR na reposição de níveis de GSH e a CAT e GPOD que atuam na remoção de H_2O_2 . Por outro lado, enzimas como a SOD que atuam sobre outro tipo de ROS como o O_2^- , não apresenta quaisquer alterações nos padrões de atividade por influência do Cd. Neste ensaio, foi verificado que nenhuma das enzimas estudadas mostrou ter a sua atividade comprometida pela presença de Cd. No entanto, outros autores verificaram-no, como se pode confirmar no trabalho referido em Martins *et al.* (2010) em *Nicotiana tabacum* tendo sido observada uma diminuição da atividade da SOD, embora a atividade da CAT e da APX não tivessem apresentado diferenças significativas. Também Schutzendubel *et al.* (2001) verificou a inibição da SOD, mas também da CAT e APX, para concentrações de 50 μM Cd. Assim, embora muitas destas enzimas não tenham a sua atividade aumentada como resposta ao stresse por Cd, a sua atividade de um modo geral mantém-se, mostrando que o Cd não afeta a sua síntese nem o seu funcionamento normal a um nível considerável.

5.3.7. Avaliação integrada da resposta da planta de espinafre à toxicidade induzida por Cd

Com os resultados obtidos neste capítulo foi possível desenhar um esquema metabólico de resposta global que permitiu às plantas de espinafre um eficaz sistema de defesa antioxidante. Estes esquemas são distintos em folhas de plantas jovens e adultas (figura 5.20), bem como raízes de plantas jovens e adultas (figura 5.21).



Em plantas jovens ocorre a produção de H_2O_2 e consequentemente a peroxidação lipídica, apesar de menos evidente em raízes. Por consequência da produção desta espécie e da degradação de lípidos, nomeadamente de membranas, existe a ativação do sistema de defesa.

Em folhas de plantas jovens (figura 5.20), neste sistema demonstraram atuar as enzimas APX, GPOD e CAT na remoção de H_2O_2 e a GR provavelmente na produção de GSH. A GSH não demonstrou ser utilizada pela GPX (sem alteração de atividade face ao controlo), deste modo prevê-se que seja utilizada para produção de PC. A SOD em plantas de espinafre também não demonstrou ser ativa na presença de Cd.

Por outro lado em raízes (figura 5.21), verificou-se um desenho metabólico muito semelhante, mas sem aumento da atividade da APX na presença de Cd. Em ambos os órgãos da planta verificou-se a ação de carotenoides como potentes oxidantes de ROS, revelando um papel importante para o sistema antioxidante.

Em plantas adultas verifica-se igualmente a produção de H_2O_2 e consequentemente a peroxidação lipídica, com menor expressão em raiz, ativando o sistema defesa antioxidante.

Em folhas de plantas adultas, tal como em plantas jovens, verificou-se um aumento da atividade da APX, GPOD, CAT e GR. A APX, GPOD e CAT atuam sobre o H_2O_2 e a GR permitiu produzir GSH, não para ser substrato da GPX, mas para produção de PC, que demonstraram ter uma grande importância do sequestro de Cd. Em plantas adultas foi também possível identificar um aumento de AO, outro tipo de sequestradores.

Em folhas verificou-se um aumento significativo dos teores de ácido cítrico e málico, enquanto que em raízes houve um aumento de ácido málico e malónico. Além desta diferença, as raízes de plantas adultas destacam-se das folhas pela inexistência de degradação lipídica e pela menos acentuada atividade da APX na presença de Cd. Também em plantas adultas, se verificou a ação de carotenoides, nomeadamente a Lut, Vio, Neo e Ant, na proteção contra os ROS.

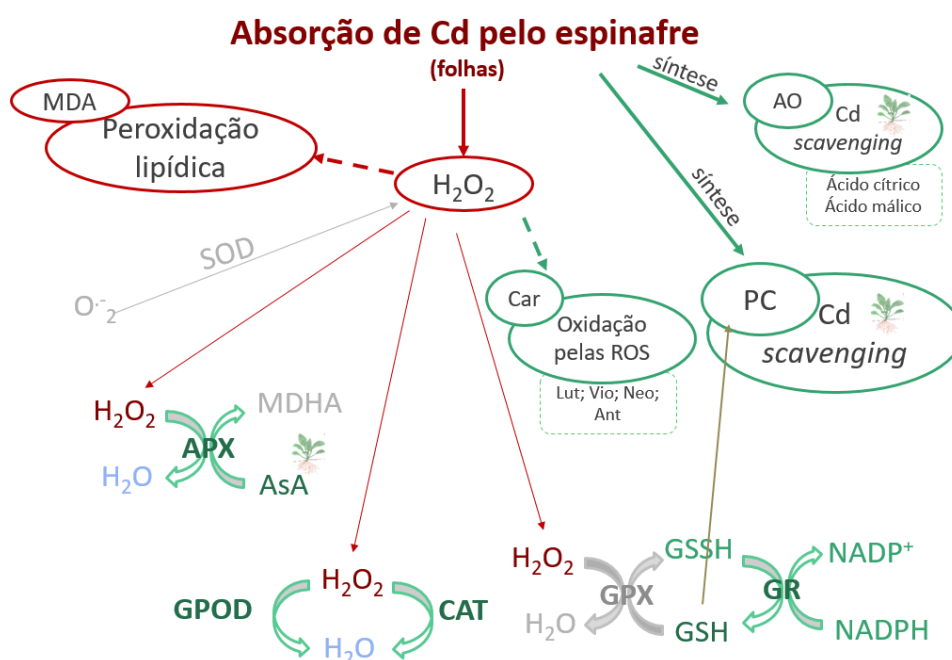


Figura 5.20 - Esquema metabólico da resposta antioxidante em folhas de planta de espinafre exposta a Cd. A vermelho, estão representados compostos ou reações prejudiciais para a célula; a verde mecanismos de defesa ativos; a cinza mecanismos de defesa ou reações inativas; a imagem de espinafre (🌱) representa mecanismos determinados e quantificados apenas em plantas adultas.

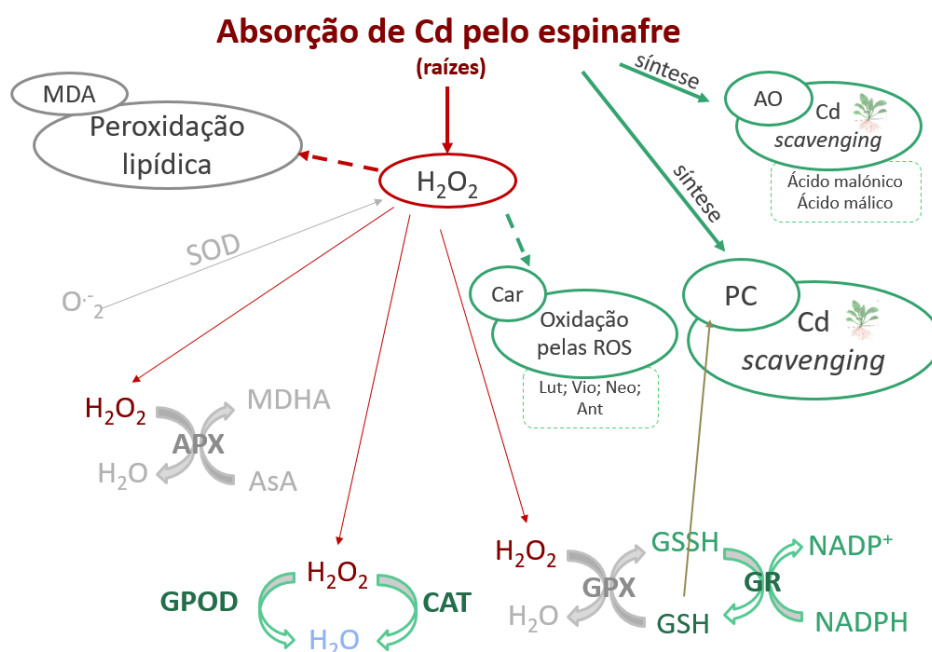


Figura 5.21 - Esquema metabólico da resposta antioxidante em raízes de planta de espinafre exposta a Cd. A vermelho, estão representados compostos ou reações prejudiciais para a célula; a verde mecanismos de defesa ativos; a cinza mecanismos de defesa ou reações inativas; a imagem de espinafre (🌱) representa mecanismos determinados e quantificados apenas em plantas adultas.



5.4. Conclusão

A concentração de Cd em folhas plantas de espinafre jovens expostas a 25 e 50 μM durante 14 dias foram de $31,40 \pm 0,16$ mg de Cd kg^{-1} MF e em plantas adultas de $10,12 \pm 0,37$ mg de Cd kg^{-1} MF, ultrapassando em qualquer dos casos o valor permitido por lei de 0,2 mg de Cd kg^{-1} MF (Reg. (CE) nº629/2008). A acumulação de mais de 100 mg kg^{-1} de Cd MS em folhas ($314,00 \pm 1,6$ mg de Cd kg^{-1} plantas jovens e $101,20 \pm 3,7$ mg de Cd kg^{-1} plantas adultas), reforça a ideia de que o espinafre pode ser considerado uma planta hiperacumuladora, sem demonstrar sinais visíveis de toxicidade.

As concentrações de Cd em plantas jovens afetaram negativamente a concentração de Mg, Fe, Zn e Mn, principalmente na parte aérea, por outro lado, observa-se um estímulo na acumulação de Ca. Em plantas adultas, o Zn e o Mn foram os elementos mais afetados negativamente pela presença de Cd. A alteração das concentrações destes nutrientes pode ser justificada pela competição pelos mesmos transportadores, verificando-se, neste caso, uma acumulação maioritária de Ca e Cd (Clemens, 2006a; Gallego *et al.*, 2012)

Verificou-se que os níveis de H_2O_2 em folhas aumentaram com o aumento da concentração de Cd, como consequência do stresse oxidativo induzido por este metal. Contudo em raízes a concentração de H_2O_2 apresenta menores variações, demonstrando que a produção em excesso está a ser controlada por algum mecanismo, provavelmente a ação da CAT e GPOD, que é significativamente superior em raízes de plantas contaminadas. Como consequência da peroxidação lipídica pelos ROS existe o aumento da concentração de MDA em folhas com o aumento da concentração de Cd. Em raízes a concentração de MDA aumenta apenas, em plantas jovens com 14 dias de exposição.

A atividade concertada do sistema antioxidante enzimático com o sistema antioxidante não enzimático, permitiu, na planta de espinafre, o controlo do balanço entre a produção e a eliminação de ROS, e consequentemente o controlo do stresse oxidativo induzido pelo Cd. O AsC, como substrato da APX, demonstrou seguir o comportamento desta, verificando-se o aumento da concentração de AsA em folhas nas mesmas condições em que se verificou o aumento da atividade da APX, na presença de Cd. A diminuição da concentração de GSH é acompanhada pelo aumento da produção de PC. O aumento da atividade da GR, responsável pela regeneração da GSH e a inexistência de alteração da atividade da GPX, que utiliza a GSH como substrato, reforçam o mecanismo de produção de PC descrito. Por outro lado, a CAT e a GPOD, demonstraram um comportamento bem definido na remoção de H_2O_2 ,



atuando em maior extensão do que a APX, provavelmente devido aos elevados níveis de substrato.

As PC demonstraram ser o sequestrador mais importante de Cd em espinafres, contudo também se verificaram alterações na concentração de AO e carotenoides. A Lut, Ant, Neo e Vio em plantas jovens e a Ant e Vio em plantas adultas foram os carotenoides que diminuíram na presença de Cd, possivelmente por oxidação por ação na redução dos níveis de ROS. Os ácidos orgânicos como quelantes, em folhas, aumentaram a sua concentração na presença de Cd, verificou-se o aumento significativo de ácido cítrico e málico, em raízes as variações foram menos evidentes observando-se ao 14º dia de ensaio o aumento não significativo de ácido malónico e málico.

Através da compreensão dos mecanismos de resposta induzidos pelo efeito tóxico do Cd, podemos salientar que as PC são os sequestradores mais importantes de Cd mas a sua ação está dependente da atividade da GR. A manutenção dos níveis de ROS é assegurada principalmente pela atividade de enzimas como a CAT, a GPOD, mas a APX apenas em algumas situações tem um papel neste processo. No entanto, a ação antioxidante dos carotenoides pode ser também um fator importante neste processo. É com este equilíbrio entre metabolitos e pela conjugação de diferentes fatores que é possível compreender como esta planta resiste a concentrações até 50 μM de Cd sem demonstrar danos visíveis.

Este estudo foi realizado em solução nutritiva, mas deve-se ter em conta que, no solo, a interação solo-planta acrescenta um conjunto de fatores que podem alterar a capacidade de acumulação de Cd, a tolerância da planta de espinafre bem como possivelmente os mecanismos de resposta envolvidos. Neste sentido foi desenvolvido um ensaio em solos, para simulação da produção da cultura de espinafre num ambiente contaminado.

Capítulo VI

Ensaio em solo artificialmente
contaminado com Cd



Capítulo VI – Ensaio em solo artificialmente contaminado com Cd

6.1. Introdução

A contaminação de solos agrícolas é um problema mundial que pode ser provocado pela deposição de metais pesados, devido ao mau uso de pesticidas e fertilizantes, à utilização de efluentes industriais na irrigação de culturas, a atividades de extração de minérios e fundição, emissões de indústrias e veículos de transporte (Mohamed *et al.*, 2010; Nagajyoti & Sreekanth, 2010; Bai *et al.*, 2013; Irfan *et al.*, 2013).

O cádmio apresenta uma solubilidade relativamente elevada e é facilmente absorvido pelas plantas cultivadas, podendo contaminar a cadeia alimentar por consumo direto ou indireto destas plantas pelo homem (Clemens *et al.*, 2013; Antonious *et al.*, 2013; Choppala *et al.*, 2014). Além disso, apresenta um elevado potencial de acumulação em diferentes órgãos de animais, levando a potenciais efeitos adversos sobre a saúde humana. Vários estudos revelaram que 60 a 80 % dos metais pesados detetados em humanos residentes em áreas urbanas, resultaram do consumo de alimentos contaminados e não da poluição atmosférica (Irfan *et al.*, 2013). Neste contexto a FAO / OMS recomenda, para o Cd, uma dose semanal tolerável provisória de 7 mg kg⁻¹ de peso corporal (EFSA, 2009).

Os vegetais de folha são uma parte importante da dieta humana e a produção de plantas em solos contaminados pode ser uma via importante para a entrada de substâncias tóxicas no corpo humano. Os valores médios da concentração de Cd em solos, em todo o mundo, variam entre 0,2 e 1 mg kg⁻¹, mas estes podem ser muito superiores em solos contaminados (Clemens *et al.*, 2013). Irfan *et al.* (2013) descreve gamas de concentração de Cd em solos entre 0 e 1 mg kg⁻¹ como valores normais e entre 3 a 10 mg kg⁻¹ como valores de Cd em solos contaminados. Naturalmente, a capacidade das plantas para crescer em solos contaminados é altamente dependente de condições ambientais, bem como das espécies de plantas (Mourato *et al.*, 2012; Boussen *et al.*, 2013).

O espinafre é um vegetal de folha largamente consumido sendo também uma importante fonte de nutrientes. A FAO (*Food Agriculture Organization*) estima que em 2014 mais de 23.000 milhões de toneladas de espinafre foram produzidas em todo o mundo, a grande maioria na China, estando este valor subestimando pois não inclui pequenas produções (FAO, 2015). O espinafre é pouco sensível à contaminação por cádmio, sendo conhecido por ser capaz de crescer de forma saudável em meios contaminados e, ao mesmo tempo, acumular grandes quantidades deste metal (Sinha *et al.*, 2007; Atkinson *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2013; Pinto *et*



al., 2016). Num estudo comparando o crescimento de nove vegetais diferentes em solos tratados com resíduos, Atkinson *et al.* (2012) demonstraram que o espinafre foi capaz de acumular mais metais pesados do que outros vegetais, com exceção da alface que acumulou mais Cd do que o espinafre. Sinha *et al.* (2007) também observaram bons rendimentos de plantas de espinafre desenvolvidas em solos contaminados, com alta acumulação de metais na parte edível.

Várias técnicas são usadas para corrigir solos contaminados com metais pesados (Mulligan *et al.*, 2001). A aplicação de matéria orgânica é uma das técnicas de menor custo, capaz de controlar a mobilidade de metais no solo por precipitação, adsorção ou complexação, podendo também apresentar um efeito positivo sobre o crescimento e rendimento das culturas (Mohamed *et al.*, 2010; Antonious *et al.*, 2013; Bai *et al.*, 2013).

No entanto, a influência de substâncias orgânicas na disponibilidade de metais pesados depende da natureza dos metais, do tipo de solo e das propriedades da matéria orgânica e em particular da presença de substâncias húmicas (Mohamed *et al.*, 2010). As substâncias húmicas, designadamente os ácidos húmicos (HA) e ácidos fúlvicos (AF), são frações importantes da matéria orgânica do solo, e a sua capacidade de ligação a metais desempenha um papel importante na restrição da sua mobilidade (Hernandez-Soriano & Jimenez-Lopez, 2012). No entanto, alguns resultados contraditórios têm surgido, uma vez que a matéria orgânica pode reduzir a disponibilidade de elementos para as plantas, mas por outro lado pode aumentá-la em certas circunstâncias (Bai *et al.*, 2013).

Li *et al.* (2008) descreve um ensaio onde refere que a incorporação de dejetos de suínos em solos contaminados diminuiu a concentração de Cu e Cd disponível em 76,1 % e 25,7 %, respetivamente. Noutro estudo, a aplicação de estrume de galinha diminuiu a concentração de Cd solúvel em 71,8 - 95,7 %, mas aumentou a precipitação de Cd inorgânico e Cd ligado em complexos orgânicos (Liu *et al.*, 2009).

A planta de espinafre demonstrou ser um vegetal capaz de acumular elevadas concentrações de Cd em folhas, sem que haja alterações visíveis que revelem a existência de contaminação, pelo que podem inadvertidamente ser consumidas pelo ser humano. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da aplicação de matéria orgânica (MO) a solos contaminados com Cd como forma de reduzir a sua mobilidade no solo e avaliar esse efeito em plantas de espinafre. Para isso, foi efetuada a adição de chorume de bovino (CB) obtido numa quinta de gado leiteiro perto de Lisboa, a solos previamente contaminados com cádmio e que foram utilizados para a produção de espinafres.



6.2. Materiais e métodos

O delineamento do ensaio desenvolvido está descrito em 2.1.4. As plantas de espinafre foram germinadas em cilindros *Jiffy*, e ao fim de 35 dias de crescimento foram transferidas para solos artificialmente contaminados com Cd. Os solos continham 0, 2 e 10 mg Cd kg⁻¹, e aos quais foram adicionadas diferentes percentagens de CB (0 % - controlo, 2,5 %, 5 %, 10 %). O ensaio decorreu até setenta dias após a germinação, após o que foram obtidas amostras de solo e de plantas para avaliação dos parâmetros a analisar.

Nas plantas foi determinada a concentração de Cd por EAA (2.3.1.), bem como elementos essenciais. No solo foram efetuadas as seguintes determinações: pH e condutividade (2.4.1.), elementos químicos totais (2.4.2.1.), macronutrientes disponíveis (bases de troca) (2.4.2.2.), micronutrientes disponíveis (2.4.2.3.), carbono orgânico total (2.4.3) e NPK extraíveis (2.4.4.).

As metodologias descritas em 2.4.5. foram também utilizadas para a caracterização do CB.

6.3. Resultados e Discussão

A incorporação de MO pode causar um efeito positivo sobre o crescimento e a produção de culturas em solos contaminados (Antonious *et al.*, 2013; Mohamed *et al.*, 2010; Sinha *et al.*, 2007). Na tabela 6.1, são apresentados os parâmetros de caracterização do CB utilizado, demonstrando ser um material rico em nutrientes essenciais para o desenvolvimento de plantas e com elevado pH, devendo apenas ser utilizado em solos ligeiramente ácidos. Na tabela 6.2 apresentam-se os dados da caracterização do solo utilizado.

Na figura 6.1 são apresentados os resultados para a biomassa da parte aérea de plantas de espinafre obtidos no final do ensaio. Estes resultados indicam um aumento na produção de biomassa em plantas correspondendo ao desenvolvimento das plantas durante o tempo do ensaio, tanto em solos contaminados como em solos não contaminados. A biomassa das plantas que cresceram no solo controlo é semelhante à das plantas em solo contaminado em que houve adição de 10 % de CB, mas este crescimento foi sempre inferior ao verificado nas plantas em solos contaminados, aos quais foi adicionado 2,5 e 5 % de CB.



Tabela 6.1 - Características principais do chorume de bovino (CB) utilizado (valor \pm desvio padrão) (n=3).

Parâmetro	Valor
Matéria seca (g kg ⁻¹)	11,74 \pm 0,55
Matéria orgânica (g kg ⁻¹)	7,20 \pm 0,48
pH	8,23 \pm 0,11
Condutividade (mS cm ⁻¹)	17,25 \pm 0,70
N (g kg ⁻¹)	3,45 \pm 0,86
P (g kg ⁻¹)	0,85 \pm 0,03
Na (mg kg ⁻¹)	1022,4 \pm 40,3
K (mg kg ⁻¹)	3567,8 \pm 252,9
Ca (mg kg ⁻¹)	2820,1 \pm 225,0
Mg (mg kg ⁻¹)	665,3 \pm 15,6
Fe (mg kg ⁻¹)	373,3 \pm 38,6
Cu (mg kg ⁻¹)	2,87 \pm 0,14
Zn (mg kg ⁻¹)	18,62 \pm 0,26
Mn (mg kg ⁻¹)	27,41 \pm 1,96

Efetivamente, em solos contaminados, embora tenha existido uma diminuição da biomassa com o aumento da concentração de Cd, a presença de CB a 2,5 e 5 % demonstrou ter um efeito positivo no crescimento das plantas relativamente ao controlo. Nesta proporção o CB teve a capacidade de reduzir o efeito tóxico do Cd, principalmente com a concentração de Cd no solo mais baixa testada neste ensaio, isto é, 2 mg kg⁻¹. Para a concentração de 10 mg kg⁻¹, este efeito já não foi tão favorável, e embora tivesse sido verificado ainda um aumento da biomassa comparativamente ao controlo, esse aumento foi inferior, provavelmente porque a proporção ideal de MO/Cd pode ter sido ultrapassada. A adição dessas proporções de CB, também permitiram aumentar a concentração de alguns nutrientes essenciais para as plantas (tabela 6.1), favorecendo o seu crescimento (Beesley *et al.*, 2014).



Tabela 6.2 - Características principais do solo para cada condição experimental. As barras de erro correspondem ao desvio padrão e o asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controlo (0 % CB) ($n = 3$).

Parâmetro	Nível Cd	% CB			
		0	2,5	5	10
pH (H ₂ O)	0 mg kg ⁻¹	5,03±0,12	5,80±0,12*	6,75±0,13*	7,73±0,35*
	2 mg kg ⁻¹	6,48±0,10	6,49±0,11	6,98±0,10*	7,83±0,21*
	10 mg kg ⁻¹	6,58±0,10	6,40±0,08*	7,13±0,17*	7,90±0,20*
Condutividade (mS/cm)	0 mg kg ⁻¹	0,48±0,01	0,59±0,04	0,50±0,06	0,69±0,04*
	2 mg kg ⁻¹	0,43±0,07	0,51±0,09	0,47±0,08	0,75±0,04*
	10 mg kg ⁻¹	0,54±0,05	0,48±0,04	0,54±0,04	0,75±0,02*
Carbono total (%)	0 mg kg ⁻¹	0,16±0,01	0,20±0,02*	0,25±0,01*	0,38±0,02*
	2 mg kg ⁻¹	0,17±0,02	0,21±0,01*	0,26±0,01*	0,41±0,02*
	10 mg kg ⁻¹	0,17±0,01	0,22±0,02*	0,28±0,02*	0,41±0,02*
NH ₄ ⁺ (mg kg ⁻¹)	0 mg kg ⁻¹	69,35±3,90	18,05±3,45*	2,30±0,55*	0,85±0,05*
	2 mg kg ⁻¹	87,90±10,20	27,60±3,05*	3,40±0,25*	1,60±0,30*
	10 mg kg ⁻¹	59,50±2,80	7,80±0,55*	2,10±0,30*	5,45±0,45*
NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹)	0 mg kg ⁻¹	486,6±63,4	466,9±75,9	243,1±12,6*	265,9±17,4*
	2 mg kg ⁻¹	562,5±41,4	398,7±32,6*	176,5±14,5*	223,9±19,5*
	10 mg kg ⁻¹	657,0±93,3	438,3±15,1*	257,4±2,9*	178,0±1,1*
P (mg kg ⁻¹)	0 mg kg ⁻¹	52,5±2,3	129,4±13,7*	243,5±24,7*	446,6±53,6*
	2 mg kg ⁻¹	65,4±15,8	150,5±23,9*	241,2±26,7*	480,7±43,8*
	10 mg kg ⁻¹	51,6±12,4	139,5±16,8*	232,6±17,8*	410,2±32,8*
K (mg kg ⁻¹)	0 mg kg ⁻¹	160,2±44,0	258,1±51,1*	383,1±46,8*	831,2±127,8*
	2 mg kg ⁻¹	160,2±16,6	323,6±38,7*	389,7±24,8*	408,8±39,0*
	10 mg kg ⁻¹	205,1±35,8	425,2±55,6*	513,8±83,6*	727,3±73,0*
Na (mg kg ⁻¹)	0 mg kg ⁻¹	70,1±17,9	125,4±10,3*	129,3±26,2*	289,1±31,3*
	2 mg kg ⁻¹	82,3±22,9	153,7±24,1*	139,9±14,7*	264,0±37,8*
	10 mg kg ⁻¹	58,2±12,9	116,6±18,9*	168,4±16,9*	230,8±26,5*
Ca (mg kg ⁻¹)	0 mg kg ⁻¹	99,8±16,8	143,4±33,0	158,8±24,7*	280,3±18,4*
	2 mg kg ⁻¹	109,5± 20,3	143,1±21,7	175,8±9,8*	271,8±26,1*
	10 mg kg ⁻¹	121,0±10,5	153,5±25,7	189,9±13,6*	251,2±11,0*
Mg (mg kg ⁻¹)	0 mg kg ⁻¹	39,7±6,8	50,1±9,2	59,3±8,2*	130,9±11,9*
	2 mg kg ⁻¹	26,9±6,7	49,6±6,4*	59,8±5,2*	123,8±12,6*
	10 mg kg ⁻¹	30,7± 3,5	50,8±9,2*	70,7±9,5*	114,7±13,6*
Fe (mg kg ⁻¹)	0 mg kg ⁻¹	6,6±1,0	9,3±0,8*	12,9±0,9*	21,3±1,3*
	2 mg kg ⁻¹	5,7±0,6	9,0±0,3*	12,4±0,8*	23,2±2,6*
	10 mg kg ⁻¹	4,7±0,3	10,3±0,9*	12,0±1,1*	23,7±2,8*
Cu (mg kg ⁻¹)	0 mg kg ⁻¹	1,1±0,1	1,2±0,0	1,3±0,0*	1,5±0,1*
	2 mg kg ⁻¹	1,2±0,1	1,3±0,0	1,3±0,1	1,4±0,1*
	10 mg kg ⁻¹	1,2±0,0	1,3±0,1	1,3±0,1	1,4±0,1*
Zn (mg kg ⁻¹)	0 mg kg ⁻¹	0,7±0,2	1,5±0,2*	2,2±0,4*	3,6±0,1*
	2 mg kg ⁻¹	0,8±0,0	2,0±0,4*	2,7±0,3*	4,3±0,5*
	10 mg kg ⁻¹	1,0±0,2	2,4±0,5*	3,0±0,6*	3,7±0,5*
Mn (mg kg ⁻¹)	0 mg kg ⁻¹	1,5±0,2	3,6±0,8*	3,6±0,3*	6,3±0,7*
	2 mg kg ⁻¹	1,6±0,5	3,5±0,8*	3,8±0,8*	6,9±0,7*
	10 mg kg ⁻¹	1,8±0,5	3,0±0,5*	4,1±0,6*	5,9±0,6*

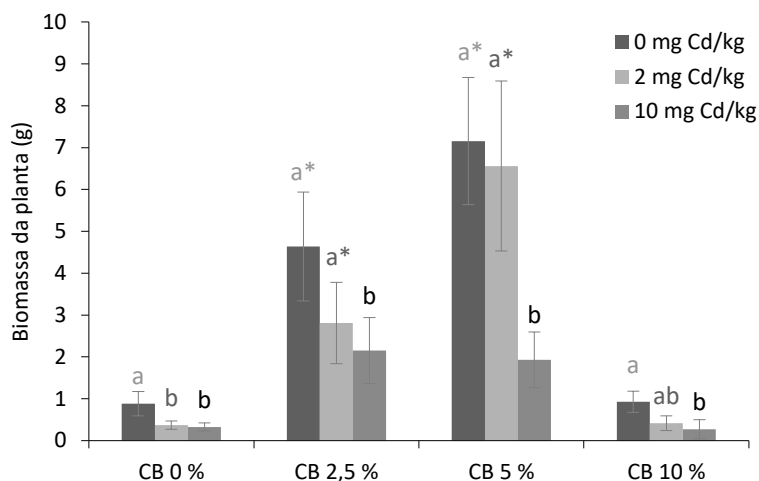


Figura 6.1 - Biomassa da parte aérea de plantas de espinafre 70 dias após a germinação.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão, diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os entre os tratamentos de Cd para cada concentração de CB e o asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controlo (CB 0 %) ($n = 12$).

Uma possível causa para o efeito positivo da adição de CB ao solo pode ser o aumento do pH (tabela 6.2). As plantas de espinafre crescem melhor a um pH entre 6,0 e 7,5 (Morelock & Correll, 2008), verificando-se melhores níveis de biomassa pela adição de 2,5 e 5 % de CB, face ao solo inicial, mais ácido. O pH acima de 7,5 para a planta de espinafre, pode tornar-se desfavorável ao crescimento pois diminui a disponibilidade dos nutrientes, tornando-os menos móveis e por isso menos absorvidos pela planta (Morelock & Correll, 2008; Quelhas, 2012). Por outro lado, este aumento do pH pode favorecer a diminuição da disponibilidade de Cd e por essa razão diminuir o seu efeito tóxico na planta.

Com a adição de 10 % de CB a produção de biomassa apresentou níveis próximos do controlo, não sendo observados efeitos benéfico no crescimento. Esta redução na produção de biomassa com o aumento da MO pode-se dever à natureza desta (Inaba & Takenaka, 2005) e a fatores muito diversos como tem sido referido por outros autores (Narwal & Singh 1998; Bai *et al.*, 2013). Como se pode observar pela tabela 6.2, as características do solo foram alteradas pela adição do CB, tendo-se observado um aumento significativo do pH e da condutividade que pode ter um impacto na produtividade da planta. Tal como é referido por alguns autores, uma elevada razão C/N pode provocar a imobilização de azoto e também de fósforo, conduzindo a uma libertação mais lenta destes nutrientes e desta forma diminuir o desenvolvimento da planta (Quelhas, 2012; Bai *et al.*, 2013). No entanto, a razão C/N do CB usado neste trabalho foi inferior à da matéria orgânica utilizada noutros trabalhos (Bai *et al.*, 2013). A diminuição da produtividade de plantas de trigo e arroz com o aumento da matéria



orgânica aplicada também foi observado por outros autores (Narwal & Singh, 1998; Bai *et al.*, 2013). Este autor atribui esse efeito de diminuição da biomassa com a aplicação de teores elevados de MO à possibilidade da presença substâncias tóxicas nessa matéria aplicada.

Na figura 6.2 apresentam-se as concentrações de Cd absorvidas pelas diferentes partes da planta. Estes resultados confirmam que o efeito tóxico observado na aplicação de 10 % de CB não se deve apenas à absorção de Cd pelas plantas de espinafre.

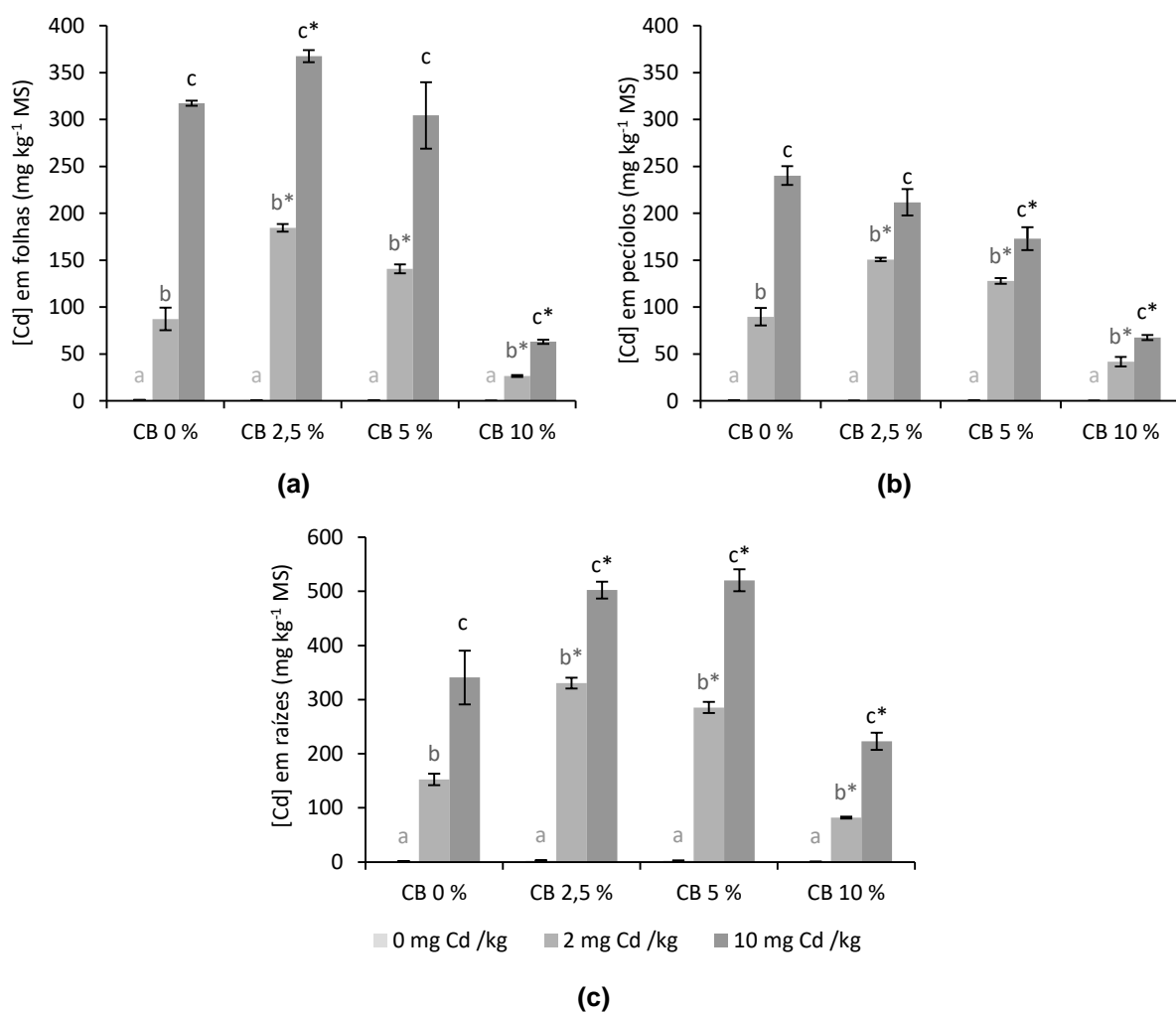


Figura 6.2 - Concentração de Cd em folhas (a), pecíolos (b) e raízes (c) de plantas de espinafre expostas a 2 mg kg⁻¹ e 10 mg kg⁻¹ de Cd, com diferentes níveis de CB (0 % - controlo, 2,5 %, 5 % e 10 %) durante 35 dias.

As barras de erro representam o desvio padrão, o asterisco indica diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controlo e os restantes níveis de CB, para cada concentração de Cd. Diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de Cd, para cada nível de CB ($n = 3$).



De facto, apenas a esta concentração de CB foi observado um decréscimo significativo na concentração de Cd em todos os tecidos de plantas analisadas, o que pode ser explicado pelo aumento do pH, causando a formação de $\text{Cd}(\text{OH})^+$ e desta forma aumentando a adsorção deste metal ao solo (Bai *et al.*, 2013). A adição de 2,5 e 5 % de CB, para ambas as concentrações de Cd estudadas (2 e 10 mg kg^{-1}), não provocou um decréscimo significativo na absorção de Cd pelas plantas de espinafre. No entanto, estes níveis de CB são suficientes para melhorar a produção da biomassa da planta, indicando que, apesar do aumento do teor de Cd na planta, os fatores que influenciam positivamente o crescimento da planta superaram o efeito tóxico induzido por Cd. Efetivamente foi obtido um aumento significativo na absorção de Cd pelas raízes, para ambas as concentrações aplicadas de CB 2,5 e 5 %, que pode estar relacionado com o aumento da solubilidade de Cd.

O aumento do teor em ácidos húmicos do solo por meio da adição de CB também pode aumentar a absorção de Cd pelas plantas como foi demonstrado por outros autores (Evangelou *et al.*, 2004). Outra explicação poderia ser a formação de compostos solúveis que reduzem a afinidade de Cd à matéria orgânica, como o CdCl^+ (Adriano *et al.*, 2004).

Por outro lado, observou-se o efeito contrário quanto se aplicou 10 % de CB. Como a concentração de metal na solução do solo é dependente de pH, da natureza e da quantidade de iões orgânicos e inorgânicos (Bolan *et al.*, 2014), o valor mais elevado de pH do solo resultante da aplicação de 10% de CB, pode aumentar a complexação de Cd à matéria orgânica reduzindo a sua absorção pelas plantas (Adriano *et al.*, 2004). Aparentemente, as concentrações mais baixas de CB não são suficientes para provocar este efeito.

O nível de CB também afetou a distribuição de Cd nas diferentes partes da planta. Na figura 6.3 é apresentada a percentagem de Cd total que se acumula em folhas, pecíolos e raízes em relação ao total absorvido pela planta. Como se pode observar, as plantas que cresceram em solos com uma percentagem de CB superior mostraram um aumento dos níveis de Cd nas raízes acompanhados de uma diminuição nas folhas. Isto indica que a translocação de Cd das raízes para as folhas diminuiu com o aumento da percentagem de CB adicionado. Este efeito é mais pronunciado no tratamento com 10 mg kg^{-1} face ao 2 mg kg^{-1} . A explicação para esta diminuição na translocação, e, portanto, de uma maior retenção de Cd nas raízes, está provavelmente relacionada com a ativação de mecanismos de tolerância das plantas de espinafre ao Cd, sob elevados níveis de CB. Khan *et al.* (2015) sugerem que a adição de CB para o solo leva a uma maior disponibilidade de compostos de enxofre que induzem uma maior síntese de glutatona e consequentemente de fitoquelatinas (PC) nas raízes.

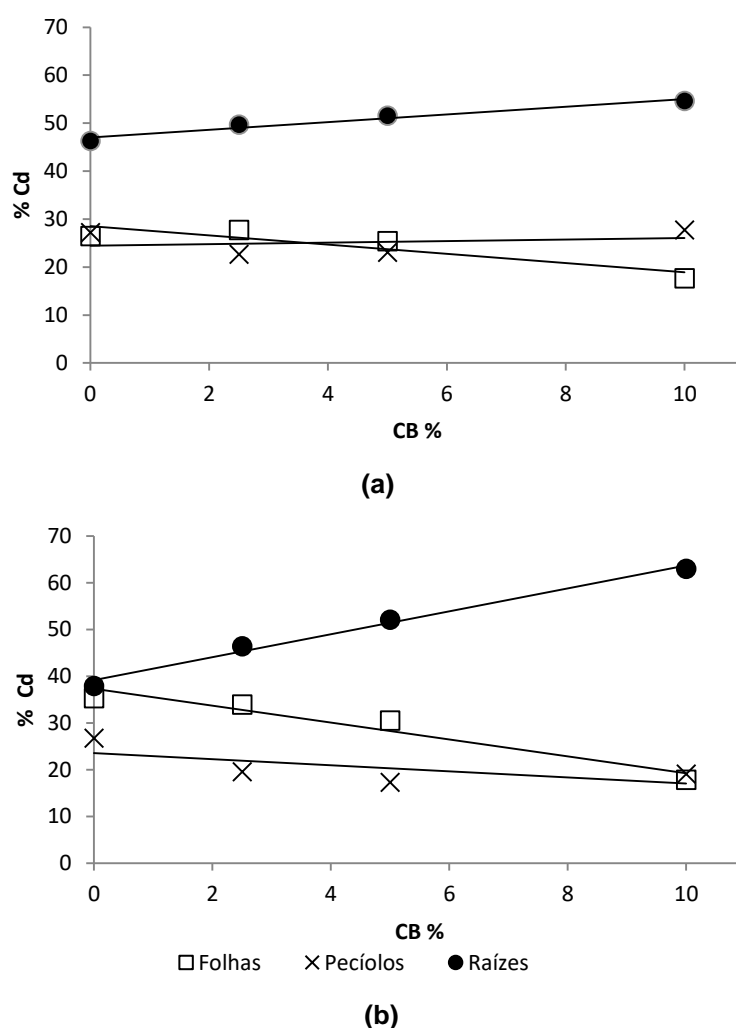


Figura 6.3 - Percentagem de Cd em cada parte da planta (folhas, pecíolos e raiz) em função do tratamento com CB para 2 mg kg⁻¹ (a) e 10 mg kg⁻¹ (b).

□ Folhas: (a) $y = -0,9595x + 28,517$; $R^2 = 0,8201$ (b) $y = -1,8081x + 37,327$; $R^2 = 0,9355$

● Raízes: (a) $y = 0,7987x + 47,031$; $R^2 = 0,9625$ (b) $y = 2,4533x + 39,158$; $R^2 = 0,9887$

× Pecíolos: (a) $y = 0,1608x + 24,452$; $R^2 = 0,0657$ (b) $y = -0,6452x + 23,515$; $R^2 = 0,4417$

Estes compostos, tal como descrito no capítulo V, são muito importantes na resistência de plantas à toxicidade por metais pesados, especialmente Cd, uma vez que podem formar complexos com este metal e transportá-lo para os vacúolos (Seth *et al.*, 2012).

Assim, a tolerância da planta pode aumentar e pode ser parte da explicação para os resultados obtidos em que se observou um melhor crescimento das plantas sob maiores concentrações de Cd quando cultivados em solos contendo CB. Além disso, esta também pode ser uma explicação para a diminuição da translocação de Cd entre raízes e folhas, pois um aumento na síntese de PC irá provavelmente conduzir a uma maior retenção dos



complexos Cd-PC nos vacúolos das raízes. É claro que a possibilidade de que outros ligandos estejam envolvidos neste fenómeno de complexação não pode ser excluída, mas, tal como verificado no capítulo V, as PC são efetivamente um dos compostos mais importantes envolvidos na defesa contra a toxicidade do Cd (Mourato *et al.*, 2015). Pinto *et al.* (2004) relataram um aumento da acumulação de Cd na parte aérea em relação às raízes de plantas de sorgo, com o aumento da matéria orgânica, mas estes resultados foram obtidos em solução nutritiva e os autores explicam que se deve a uma baixa biodisponibilidade de Cd.

O espinafre é descrito como um alimento rico em elementos minerais (Citak & Sonmez, 2009), pelo que é importante avaliar de que modo as diferentes condições de crescimento afetaram as concentrações desses elementos. Tem sido descrito que o Cd pode ser absorvido pelas plantas através dos transportadores de catiões essenciais, como o Ca, Zn, Fe, Mg e Cu, podendo portanto afetar a homeostase dos elementos na planta (Gallego *et al.*, 2012). No entanto, estes efeitos são altamente dependentes da espécie da planta e do metal (Martins *et al.*, 2013). Na tabela 6.3 são apresentadas as concentrações dos elementos essenciais em folhas e raízes.

Como se pode observar nessa tabela, a concentração de K diminuiu com a absorção de Cd, sendo este efeito mais pronunciado em raízes do que em folhas, tal como observado nos dados do capítulo V. Em relação aos teores de K nas folhas, podemos concluir que a planta demonstrou ser capaz de compensar os níveis de K, mantendo os valores próximos do controlo, e apenas em solos com 10 mg Cd kg⁻¹ existe uma diminuição significativa da concentração deste elemento. No entanto, em folhas de plantas controlo a concentração de K foi sempre inferior em plantas expostas a Cd. O K apresenta uma função osmótica em plantas podendo ser substituído pelo Na em plantas com um considerável potencial de absorção de Na, como o espinafre (Mengel, 2007). Os resultados obtidos estão de acordo com este facto, pois simultaneamente também é verificado um aumento da concentração de Na em plantas que se desenvolveram na presença de Cd. Para além disso, já foi referido que uma menor concentração de K pode também estar relacionada com o aumento de Ca livre no citosol que promove a abertura de canais de aniões, na membrana celular, e consequentemente a saída de K (Dal Corso *et al.*, 2010).



Tabela 6.3 – Concentração de elementos em folhas (F), pecíolos (P) e raízes (R) de plantas de espinafre para cada tratamento experimental por massa seca. O símbolo ± corresponde ao desvio padrão, diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos de Cd para cada concentração de CB (0 % CB) ($n = 3$).

Elemento da planta	Parte da planta	Tratamento											
		0% CB				2,5% CB				5% CB			
		0 mg kg ⁻¹	2 mg kg ⁻¹	10 mg kg ⁻¹	10 mg kg ⁻¹	0 mg kg ⁻¹	2 mg kg ⁻¹	10 mg kg ⁻¹	10 mg kg ⁻¹	0 mg kg ⁻¹	2 mg kg ⁻¹	10 mg kg ⁻¹	10 mg kg ⁻¹
Na (g kg ⁻¹)	F	2,80±0,36 ^a	5,34±0,30 ^b	4,66±0,14 ^b	3,68±0,17 ^a	5,98±0,25 ^b	6,10±0,08 ^b	4,96±0,29 ^a	6,08±0,19 ^b	7,59±0,23 ^c	9,65±0,57 ^a	11,34±1,46 ^a	10,09±1,09 ^a
	R	0,80±0,09 ^a	1,45±0,39 ^a	1,45±0,39 ^a	3,39±0,31 ^a	3,42±0,20 ^a	2,41±0,22 ^b	4,98±0,24 ^a	4,01±0,20 ^a	4,65±0,67 ^a	9,93±1,55 ^a	8,63±0,71 ^a	8,15±0,37 ^a
K (g kg ⁻¹)	F	52,0±2,3 ^a	35,4±2,0 ^b	35,8±2,0 ^b	72,3±8,0 ^a	65,6±0,9 ^a	63,4±3,5 ^a	80,6±5,8 ^{ab}	85,1±4,6 ^a	70,4±4,4 ^b	80,2±1,1 ^a	80,8±4,6 ^a	71,5±1,7 ^b
	R	7,88±1,87 ^a	8,42±2,51 ^a	6,48±3,0 ^a	39,3±2,7 ^a	29,6±3,6 ^b	17,0±4,3 ^c	47,9±2,5 ^a	28,6±3,0 ^b	25,3±4,9 ^b	45,8±3,7 ^a	41,8±5,1 ^a	29,5±1,0 ^b
Ca (g kg ⁻¹)	F	2,77±0,10 ^a	2,36±0,06 ^b	2,73±0,20 ^a	1,85±0,20 ^a	1,88±0,07 ^a	2,68±0,04 ^b	1,22±0,09 ^a	1,35±0,15 ^a	1,92±0,21 ^b	0,96±0,09 ^a	1,07±0,10 ^a	1,04±0,10 ^a
	R	0,75±0,04 ^a	2,22±0,30 ^b	1,71±0,28 ^b	2,31±0,20 ^a	2,37±0,28 ^a	2,35±0,23 ^a	2,29±0,07 ^a	2,35±0,09 ^a	2,92±0,24 ^b	2,82±0,12 ^a	3,57±0,31 ^b	3,56±0,25 ^b
Mg (g kg ⁻¹)	F	5,47±0,38 ^a	4,70±0,26 ^b	4,92±0,38 ^{ab}	8,47±0,51 ^a	7,85±0,20 ^a	6,80±0,22 ^b	7,24±0,24 ^{ab}	7,86±0,28 ^a	6,95±0,36 ^b	6,42±0,43 ^a	4,44±0,05 ^b	5,01±0,25 ^b
	R	1,02±0,11 ^a	2,35±0,39 ^b	1,31±0,28 ^a	6,79±0,14 ^a	4,56±0,39 ^b	3,60±0,07 ^c	7,45±0,25 ^a	5,47±0,03 ^b	6,04±0,12 ^c	6,85±0,29 ^a	5,68±0,07 ^b	5,65±0,17 ^b
Fe (mg kg ⁻¹)	F	172±17 ^a	219±15 ^b	209±9 ^b	106±8 ^a	112±13 ^a	107±7 ^a	95±18 ^a	99±8 ^a	83±8 ^a	104±9 ^a	211±28 ^b	198±35 ^b
	R	1397±18 ^a	2391±283 ^b	2205±130 ^b	1169±115 ^a	1475±82 ^b	1502±62 ^b	1030±109 ^a	1303±53 ^b	1395±46 ^b	1241±121 ^a	1853±217 ^b	2789±435 ^c
Cu (mg kg ⁻¹)	F	6,8±0,7 ^a	6,5±1,5 ^a	5,9±0,7 ^a	8,8±0,6 ^a	10,9±0,5 ^b	7,6±0,7 ^a	9,2±0,9 ^a	10,7±0,4 ^b	10,9±1,0 ^c	10,9±1,0 ^a	10,9±0,1 ^a	10,0±1,4 ^a
	R	7,7±1,7 ^a	28,1±3,4 ^b	19,6±2,2 ^c	23,3±1,6 ^a	29,3±2,1 ^b	26,2±0,7 ^{ab}	23,1±0,8 ^a	25,5±0,5 ^b	31,9±0,9 ^c	42,8±3,0 ^a	43,3±5,4 ^a	56,8±5,8 ^b
Mn (mg kg ⁻¹)	F	127,6±13,0 ^a	92,0±12,5 ^b	259,1±5,9 ^c	56,9±8,7 ^a	116,6±5,6 ^b	201,0±6,7 ^c	53,4±10,1 ^a	88,2±1,5 ^b	98,9±10,4 ^b	113,3±11,9 ^a	107,5±11,4 ^a	104,2±14,7 ^a
	R	44,0±3,0 ^a	32,1±10,7 ^a	103,1±15,4 ^b	129,1±12,3 ^a	255,8±10,6 ^b	236,1±9,6 ^b	222,2±26,6 ^{ab}	257,4±5,9 ^a	187,5±7,1 ^b	400,4±44,0 ^a	391,2±67,5 ^a	467,3±81,5 ^a
Zn (mg kg ⁻¹)	F	133,4±8,9 ^a	56,4±4,7 ^b	53,0±1,2 ^b	97,4±8,7 ^a	74,7±4,0 ^b	44,6±0,3 ^c	118,4±8,1 ^a	102,7±8,3 ^a	40,9±1,2 ^b	60,0±3,6 ^a	87,0±5,2 ^b	65,3±5,6 ^a
	R	53,5±5,1 ^a	6,8±32,7	15,0±3,1 ^b	114,7±10,4 ^a	61,7±9,3 ^b	44,8±5,6 ^b	133,9±8,8 ^a	97,8±11,7 ^b	45,7±4,3 ^c	68,2±5,7 ^a	62,1±4,5 ^{ab}	51,7±3,4 ^b



Embora os níveis de Ca tenham diminuído em folhas com o aumento da concentração de CB, não foi detetada uma correlação entre a redução dos teores de Ca com os teores de Cd. Pelo contrário, em relação à presença de Cd, foi verificado um aumento no teor de Ca em folhas de espinafre expostas a 2,5 e 5 % de CB, e 10 mg Cd kg⁻¹, tal como observado no capítulo V em plantas jovens expostas a Cd. Dado que as plantas de espinafre mostraram uma redução de crescimento na presença de Cd, o aumento observado na concentração de Ca pode estar relacionado com alterações no fluxo de Ca através da membrana plasmática, como foi proposto por Michalska & Asp (2001) que detetaram efeitos semelhantes em alface exposta a Cd e Pb.

Também para o Fe e Mn ocorreu um efeito semelhante, isto é, um aumento da concentração destes elementos em folhas e raízes, na presença de Cd no solo, mais pronunciado em solos com 0 e 10 % CB em relação ao Fe e com 0 e 2,5 % CB em relação ao Mn. Isto também pode ser devido a uma perturbação nos mecanismos de absorção destes elementos que acontece com as plantas que crescem sob a concentração de 10% CB e 10 mg kg⁻¹ de Cd.

Embora vários estudos de toxicidade pelo Cd demonstrem uma diminuição da absorção de vários iões (DalCorso *et al.*, 2008), a ocorrência de efeitos opostos, semelhantes aos descritos neste trabalho, também foram descritos (De la Rosa *et al.*, 2004; López -Millán *et al.*, 2009). A influência do Cd na acumulação no Fe difere do que foi verificado no capítulo V, pois estes foram ensaios que decorreram em condições diferentes, que podem condicionar as formas iónicas destes elementos, e consequentemente, a sua absorção pelas plantas.

A presença de Cd no meio de crescimento levou a uma diminuição da concentração de Mg na raiz, sugerindo que o Cd afetou os mecanismos de absorção de nutrientes pelas raízes, provavelmente por competição pelos mesmos transportadores. Este efeito também se refletiu nos níveis de Mg em folhas que são geralmente menores sob stresse por Cd. No entanto, esta redução não é suficientemente elevada para causar problemas de deficiência na planta.

Em relação ao Cu, foi observado um aumento da sua concentração em raízes, mas não em folhas, o que confirma que a translocação para este órgão foi afetada, principalmente com a concentração superior de Cd. Também no capítulo V, o Cu foi o elemento em que se verificou uma alteração na taxa de translocação e não de absorção pela raiz, provavelmente pela existência de transportares específicos como os CTR/COPT (DalCorso *et al.*, 2013).

O zinco foi, claramente, o elemento mais afetado pelo Cd. Para todos as percentagens de CB aplicado, a absorção de Zn pelas raízes de espinafre foi reduzida sob toxicidade de Cd, embora o efeito fosse menos pronunciado a 10 % de CB. Este facto levou a uma menor



concentração de Zn em folhas de plantas contaminadas. Os níveis normais de Zn em espinafres estão dentro dos valores de 50 e 75 mg kg⁻¹ MS, e para as plantas que crescem na presença de 10 mg Cd kg⁻¹ os valores são ligeiramente abaixo deste limite inferior, mas não suficientemente baixos para, por si só, induzirem efeitos graves de deficiência. Noutro estudo com as plantas de espinafre em solução nutritiva (Pinto *et al.*, 2016), bem como no capítulo V, foi observado o mesmo efeito da competição de Cd com Zn, confirmando que para esta planta, a absorção de Cd afeta o transporte de Zn.

Como se pode verificar na figura 6.2, apesar da concentração mais elevada de Cd ter sido detetada em tecidos radiculares, as partes acima do solo, tanto pecíolos como folhas, também acumularam quantidades consideráveis de Cd. As folhas de plantas contaminadas acumularam até 367,7 ± 6,4 mg Cd kg⁻¹ MS (correspondendo a 25,75 mg Cd kg⁻¹ MF), excedendo o valor máximo permitido para vegetais de folha (0,2 mg kg⁻¹ MF) de acordo com as normas europeias (Reg (CE) n.º 629/2008). Mesmo as plantas expostas a 2 mg kg⁻¹, foram capazes de acumular 12,91 mg Cd kg⁻¹ MF, também superior ao valor regulado.

Os resultados confirmam que o espinafre tem o potencial para ultrapassar estes níveis legislados, se as condições (concentração de Cd, meio de cultura e período de exposição) forem adequadas. Como tal, a dose semanal provisória tolerável definida pela FAO de 7 µg kg⁻¹ de peso corporal (EFSA, 2009), pode ser rapidamente ultrapassada com o consumo de espinafre altamente contaminado, numa dieta que inclua o consumo moderado desta planta.

Além disso, os dados confirmam que a adição de CB irá levar a um aumento do crescimento de plantas, mas também para o aumento da absorção de Cd, em solo contaminado. Assim, as plantas podem até ser aparentemente mais saudáveis do que aquelas que crescem sem CB, mas, ao mesmo tempo podem conter quantidades elevadas de Cd nas partes comestíveis. Isto constitui um aumento do risco para a segurança alimentar visto que, os espinafres estão aparentemente saudáveis reduzindo a probabilidade de rejeição por parte do consumidor.

Na figura 6.4 está representado o índice de tolerância relativo a amostras não contaminadas com Cd, e calculado através dos valores de biomassa.



O índice de tolerância ao Cd (figura 6.4) reflete todos os efeitos descritos anteriormente de um modo global, por comparação com as plantas não expostas a Cd. As plantas sujeitas a 5 % de CB e 2 mg Cd kg⁻¹, foram as plantas com maior tolerância ao Cd, apesar da variação entre a concentração de nutrientes para as plantas não ser distinta da aplicação de 2,5 % CB e 2 mg Cd kg⁻¹, bem como de 5 % CB e 10 mg Cd kg⁻¹ (exceção do Zn), o que pode ser um reflexo de melhores condições de crescimento como pH ótimo e/ou melhor razão C/N.

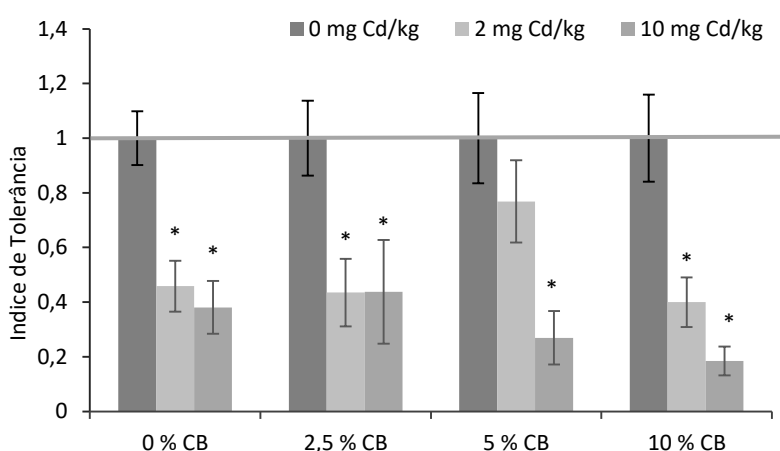


Figura 6.4 - Índice de tolerância ao Cd calculado em função da biomassa obtida.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão e o asterisco representa diferenças estatisticamente significativas entre plantas contaminadas e não contaminadas com Cd, para cada dia (n =3).

Pela figura 6.5, verificam-se os efeitos visíveis na produção de espinafres, confirmando que as melhores produções foram observadas quando aplicado CB a 2,5 e 5 %, independentemente da concentração de Cd. As plantas com melhor aspeto visual foram as que cresceram num meio com 0 mg Cd kg⁻¹ e 5 % CB e com 2 mg Cd kg⁻¹ e 2,5 % CB. Por outro lado, as plantas sujeitas a 2,5 % de CB, tanto na presença de 2 como 10 mg Cd kg⁻¹, apresentam também um aspeto saudável sem cloroses, necroses ou enrolamento de folhas, apesar da menor produtividade que só é detetada por comparação com outras culturas, o que pode levar a uma fácil aceitação pelo consumidor.

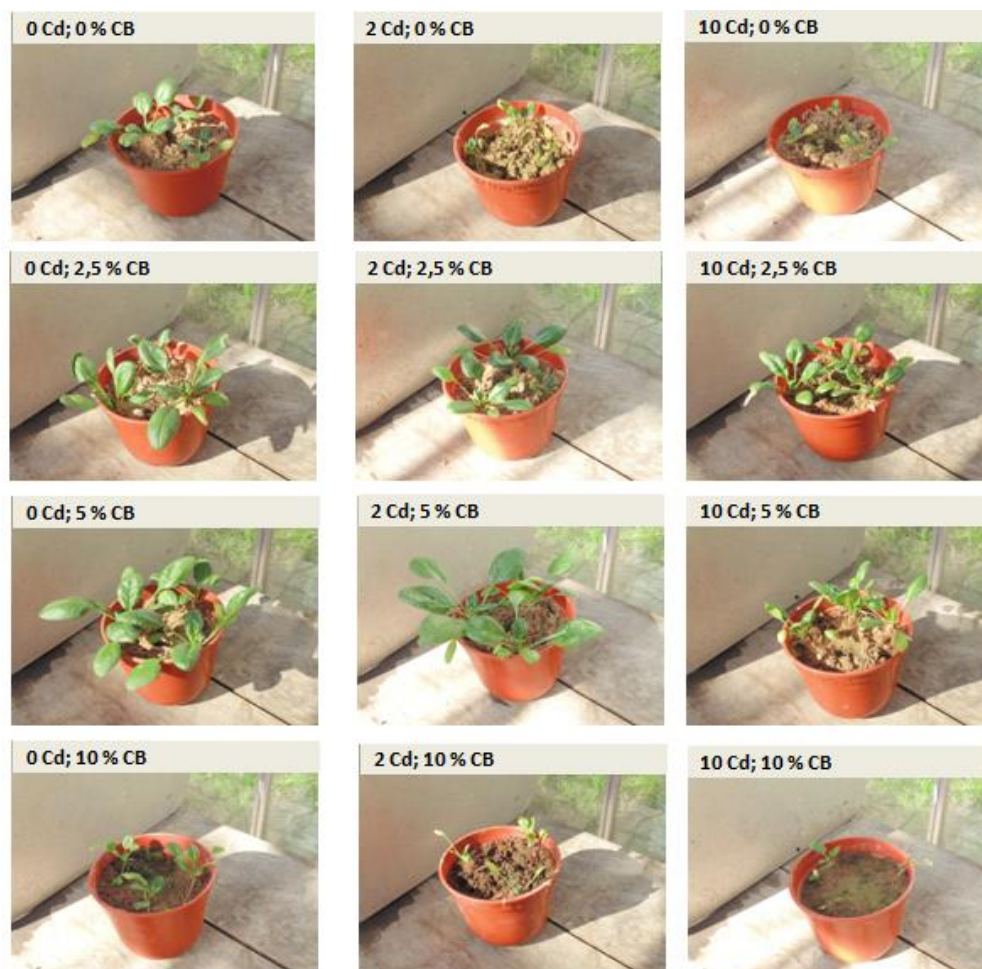


Figura 6.5 - Registo fotográfico de plantas de espinafre do Ensaio em solo artificialmente contaminado com Cd, ao sexagésimo dia de ensaio.

6.4. Conclusão

O crescimento das plantas de espinafre em solo contaminado com diferentes concentrações de Cd demonstrou respostas diferentes de acordo com a concentração de CB aplicada. Em concentrações de 2,5 e 5 % de CB, o crescimento da planta melhorou, mas a absorção de Cd não diminuiu, demonstrando que a matéria orgânica aplicada pode levar a um aumento da mobilidade de Cd no solo. Com a aplicação de 10 % de CB, verificou-se a diminuição da concentração de Cd nos tecidos vegetais, mas também uma redução do crescimento da planta, presumivelmente, devido ao pH elevado ou à elevada relação C/N. Esta é uma evidência de que existem diferentes fatores por vezes antagónicos que são altamente dependentes do nível de CB aplicado ao solo.



As plantas de espinafre com 70 dias de desenvolvimento, numa fase de desenvolvimento semelhante ao utilizado para o consumo humano, foram capazes de tolerar Cd a uma concentração de 25,75 mg kg⁻¹ folha MF não mostrando sinais visíveis de stresse, exceto uma biomassa reduzida. Estes níveis de Cd estão bastante acima dos valores máximos recomendados de acordo com os regulamentos europeus.

Tal como observado anteriormente em solução nutritiva, as plantas de espinafre que cresceram em solo contaminado com Cd, mesmo com diferentes concentrações de CB aplicado, apresentaram alguma variação na absorção de elementos essenciais para as plantas, mas não o suficiente para causar qualquer deficiência ou problemas de toxicidade. Na realidade, foi detetado um aumento nas concentrações de alguns elementos essenciais em plantas contaminadas com Cd.

Estes resultados confirmam que o CB não é adequado para reduzir a absorção de Cd em plantas de espinafre, pois nas concentrações necessárias para esta diminuição da absorção, outros fatores negativos prevaleceram causando efeitos tóxicos e uma diminuição na produção de biomassa. Outros estudos sobre a aplicação de CB ao solo devem-se concentrar em possíveis medidas corretivas, como a diminuição do pH e alterar a relação C/N, a fim de melhorar a capacidade de reter Cd no solo.

Capítulo VII

Conclusões

Capítulo VII – Conclusões

7.1. Conclusões Gerais

A planta de espinafre evidenciou uma elevada capacidade de acumulação de Cd que está dependente de uma resposta antioxidante global. Apesar da capacidade acumulativa da planta de espinafre ser uma desvantagem para o consumidor, o conhecimento detalhado da sua resposta metabólica ao Cd pode contribuir para que problemas ambientais ou agroalimentares possam mais facilmente ser ultrapassados.

Com este trabalho foi possível obter as seguintes conclusões:

- A capacidade de acumulação da planta de espinafre começa a manifestar-se muito cedo, sendo evidente para tempos muito curtos de exposição ao Cd. Em 24 h os teores de Cd nas raízes são já muito elevados, embora a translocação para a parte aérea seja inferior nesse intervalo de tempo, e não se observem efeitos visíveis de toxicidade.
- As curvas de absorção (curvas hiperbólicas) para a acumulação em 24 h mostram que a capacidade de acumulação diminui ao longo do tempo, de forma mais pronunciada tanto em pecíolos como em raízes, indicando que inicialmente há uma mais rápida acumulação e verifica-se uma diminuição da capacidade de acumulação ao longo do tempo.
- As plantas com diferentes estados de desenvolvimento, plantas jovens e plantas adultas, apresentam diferentes comportamentos de acumulação e também diferentes efeitos visíveis. As plantas jovens foram as que apresentaram maiores níveis de Cd. Em ambos os estados de desenvolvimento, após exposição a concentrações de Cd entre 0 e 100 μM durante 21 dias, foi verificada uma elevada capacidade de acumulação, o que permite considerar a planta do espinafre como uma planta hiperacumuladora ($612,72 \pm 31,11 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ MS}$ em folhas de plantas jovens e $179,48 \pm 12,39 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ MS}$ em folhas de plantas adultas).
- O Cd afetou negativamente os parâmetros vegetativos e estes efeitos foram mais intensos para as concentrações de Cd de 100 μM e para tempos de exposição mais longos (17 e 21 dias), como esperado. O aparecimento de cloroses foi mais intenso para tempos de exposição mais longos; estes efeitos foram menos intensos em plantas adultas do que em plantas jovens, em que se obtiveram diferenças significativas, para as concentrações de Cd na solução nutritiva de 5, 10 e 25 μM . Em relação à acumulação de Cd, os valores obtidos indicaram que ao 13º dia de contaminação já existe uma elevada acumulação, sem que a planta evidencie danos visíveis, o que pode constituir um problema para o consumo.

- A exposição a 25 e 50 μM de Cd durante 14 dias, tanto em plantas jovens como em plantas adultas também conduziu a uma acumulação de Cd principalmente nas folhas, acima do valor permitido por lei de 0,2 mg de Cd kg^{-1} MF (Reg. CE nº629/2008), $31,40 \pm 0,16$ mg de Cd kg^{-1} MF em plantas jovens e $10,12 \pm 0,37$ mg de Cd kg^{-1} MF em plantas adultas, sem sinais visíveis de toxicidade. Estes valores, quando referidos à MS correspondem efetivamente ao de uma planta hiperacumuladora de acordo com os valores definidos na bibliografia. Em plantas jovens, a presença de Cd no meio afetou negativamente a concentração de Mg, Fe, Zn e o Mn, principalmente na parte aérea, embora tenha sido observado um aumento nos teores de Ca. Em plantas adultas, foram o Zn e o Mn os elementos mais afetados, negativamente, pela presença de Cd.

- A resposta metabólica da planta ao stresse induzido pelo Cd, em plantas jovens e adultas, expostas a 25 e 50 μM de Cd durante 14 dias, foi caracterizada através dos diversos metabolitos cuja ação pode estar relacionada com o stresse oxidativo. Verificou-se um aumento dos níveis de H_2O_2 em folhas, mas o mesmo não aconteceu em raízes, indicando que nestes órgãos, poderá existir uma ativação de mecanismos eficazes no controlo de ROS em excesso, o que está de acordo com o aumento verificado na CAT e GPOD em raízes de plantas contaminadas e também no controlo dos níveis de MDA.

- Conclui-se que a resposta eficaz ao stresse na planta de espinafre resulta de uma ação concertada do sistema antioxidante enzimático com o sistema antioxidante não enzimático. Na presença de Cd, a CAT e a GPOD, mostraram ser fundamentais na remoção de H_2O_2 permitindo manter os níveis de ROS controlados, e consequentemente reduzir o stresse oxidativo induzido pelo Cd. Embora menos acentuado, o aumento da actividade da APX com o Cd também participa na remoção de ROS, e simultaneamente na reposição dos níveis de AsC.

- A produção de PC é um dos mecanismos com maior eficiência na redução do Cd livre na planta, verificando-se que é o sequestrador de Cd mais importante em espinafres, e a sua concentração aumentou com o tempo de exposição e aumento da concentração de Cd aplicada. Na síntese de PC é utilizada a GSH como precursor, cujos níveis parecem ser assegurados pela atividade da GR, dado que também se verificou um aumento de atividade desta enzima. Outros sequestradores como AO, também evidenciam ter um papel complementar neste processo, variando a sua concentração na presença de Cd. O aumento significativo de ácido cítrico e málico em folhas, e a diminuição de Lut, Ant, Neo e Vio em plantas jovens e a Ant e Vio em plantas adultas na presença de Cd, podem também indicar um envolvimento destes compostos no processo de destoxificação e proteção contra os ROS.

- A compreensão dos mecanismos globais de resposta induzidos pelo efeito tóxico do Cd permite salientar que a ação das PC está ligada ao funcionamento dos mecanismos enzimáticos para manter sob controlo os níveis de ROS. É com este equilíbrio entre metabolitos e pela conjugação de diferentes fatores que é possível compreender como esta planta resiste a concentrações até 50 μM de Cd sem demonstrar danos visíveis.
- A aplicação de 2,5 e 5 % de CB a um solo contaminado não reduziu a absorção de Cd pela planta, mas teores de 10 % de CB causaram menor acumulação na planta embora tivessem afetado a sua produtividade. A aplicação de CB, nas condições estudadas, não se revelou eficaz na redução da absorção de Cd, dado que em algumas modalidades, foram obtidos teores de Cd em folhas acima dos valores máximos permitidos na legislação portuguesa para hortícolas de folha.
- A utilização de plantas alimentares não é adequada para fitorremediação pois a tolerância a meios contaminados está muito provavelmente relacionada com uma elevada acumulação. Para utilização em fitorremediação, deve ser privilegiado o uso de plantas com características acumuladoras, como por exemplo plantas das mesmas famílias de acumuladoras conhecidas, mas que não sejam usadas nem para a alimentação animal nem para a alimentação humana.

7.2. Perspetivas Futuras

A conceção deste trabalho de doutoramento assenta na preocupação com a contaminação do ambiente, causada essencialmente pela presença do homem e nas consequências para a segurança alimentar das populações. As contaminações com cádmio, embora não sejam muito graves em Portugal, representam no mundo uma causa importante de contaminação do ambiente e, consequentemente, das populações. As contaminações ambientais dizem respeito ao ar, água e solo, mas em que as contaminações dos solos podem ser uma das principais origens das contaminações da cadeia alimentar, tanto em alimentos de origem vegetal como animal.

Num estudo recentemente publicado pela Organização Mundial de Saúde (2016) designado “PREVENTING DISEASE THROUGH HEALTHY ENVIRONMENTS - A global assessment of the burden of disease from environmental risks” (2016), foi avaliado o impacto das condições ambientais nas doenças das populações do mundo. Este estudo fornece uma estimativa aproximada da quantidade de doenças que podem ser impedidas por redução dos problemas ambientais e permitiu concluir que, em 2012, 23 % de todas as mortes por doença puderam ser atribuídas a causas ambientais (Prüss-Ustün *et al.*, 2016). Numa altura em que a

esperança de vida das populações é a mais elevada de sempre, ambientes mais saudáveis podem ser determinantes para uma melhor qualidade de vida, pelo que este é um tema de enorme importância.

A necessidade de produzir alimentos para uma população em crescimento obriga a produzir mais, melhor e mais rápido. É necessário aumentar a produção de alimentos, mas considerando que à medida que as populações aumentam existem cada vez menos áreas agrícolas disponíveis, tem de se produzir mais com menos recursos, com menos água e com condições cada vez mais adversas tendo em conta as alterações climáticas, e com maiores custos energéticos. As regiões onde há menor densidade populacional e com maior disponibilidade de solos são por vezes regiões de instabilidade política, a que são acrescentados problemas de natureza social, pelo que esta parece ser uma equação de difícil solução.

Com todas estas pressões, há tendência das populações para a produção de alimentos em qualquer pedaço de terra disponível, mesmo em solos contaminados. Naturalmente, é a própria natureza biológica dos alimentos que nos protege contra as situações mais perigosas, uma vez que a maior parte dos alimentos são, tal como nós, organismos vivos que são também afetados pelos contaminantes, pelo que não crescem de forma rentável em meios contaminados.

Contudo, o problema da contaminação pode surgir com plantas que são tolerantes e por isso pode haver tendência para serem essas a ser utilizadas em meios contaminados, dada a sua capacidade de resistirem ao efeito tóxico mantendo níveis de produtividade aceitáveis e muito próximos dos valores obtidos em condições ditas normais. Este foi um dos tópicos que esteve na origem deste trabalho, ou seja, a demonstração de que há plantas como o espinafre que acumulam um metal tóxico, neste caso o cádmio, em qualquer das diferentes fases de desenvolvimento, em diferentes partes da planta, sem um efeito visível mesmo quando este existe em quantidades relativamente reduzidas no meio, ou mesmo quando os tempos de crescimento das plantas são curtos, como é o caso.

O estudo realizado com o espinafre permitiu uma compreensão global do sistema de resposta da planta ao efeito tóxico do cádmio, e a possibilidade de caracterização dos processos biológicos que sustentam os mecanismos de tolerância ao efeito tóxico que este causa, de forma a se poder utilizar este conhecimento na aplicação a outras espécies vegetais e a outros contaminantes, designadamente aos chamados novos contaminantes, como os produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP), que são atualmente o novo desafio em termos de contaminação ambiental.

Os efeitos dos PFHP nas plantas não estão ainda completamente conhecidos, assim como não estão ainda totalmente identificados os mecanismos de toxicidade, de absorção e acumulação nas plantas e ainda não existe um diagnóstico completo dos possíveis perigos para um futuro próximo da sua presença no ambiente e na cadeia alimentar. Este será certamente um tema em foco nos próximos anos na investigação nesta área.

Nas condições atuais em que os recursos das populações são escassos, a utilização dos solos terá que ser racional e garantir a otimização das suas potencialidades. Em solos contaminados é absolutamente crucial garantir uma cobertura vegetal que previna a erosão, mas é fundamental evitar que esta seja obtida com plantas para fins alimentares. Este trabalho contribui também para uma maior sensibilização de uma escolha adequada das plantas a aplicar em solos contaminados, e é manifesta a vantagem de utilização de plantas tolerantes, numa perspetiva da fitorremediação.

Bibliografia

- Adriano, D. C.; Wenzel, W. W.; Vangronsveld, J.; Bolan, N. S. (2004) Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma*.122: 121-142.
- Aebi, H. E. (1983) Catalase. In *Methods in Enzymatic Analysis*. ed. U. S. Bergmeyer-Weinheim: Verlag Chemie.
- Agarwal, S. K. (2009) *Heavy Metal Pollution*. APH Publishing Corporation. Nova Deli.
- Ahmad, P.; Sarwat, M.; Sharma, S. (2008) Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. Review Article. *Plant Biology*. 51 (3): 167-173.
- Alloway, B. J. (2004) Contamination of soils in domestic gardens and allotments: a brief overview. *Land Contamination & Reclamation*. 12 (3): 178-787.
- Almeida, D. (2006) *Manual de Culturas Hortícolas - Volume I*. Ed. Presença. Barcarena, Portugal.
- Alvarenga, P.; Palma, P.; Gonçalves, A. P.; Fernandes, R. M.; de Varennes, A.; Vallini, G.; Duarte, E.; Cunha-Queda, A.C. (2008). Evaluation of tests to assess the quality of mine-contaminated soils. *Environmental Geochemistry and Health*. 30: 95-99.
- Alvarenga, P.; Palma, P.; Varennes, A.; Cunha-Queda, A. C. (2012) A contribution towards the risk assessment of soils from the São Domingos Mine (Portugal): Chemical, microbial and ecotoxicological indicators. *Environmental Pollution*. 161: 50-56.
- Ammar, W.; Nouairi, I.; Zarrouk, M.; Jemal, F. (2008a) The effect of cadmium on lipid and fatty acid biosynthesis in tomato leaves. *Biologia Plantarum*. 63 (1): 86-93.
- Ammar, W.B.; Mediouni, C.; Tray, B.; Ghorbel, M. H.; Jemal, F. (2008b) Glutathione and phytochelatin contents in tomato plants exposed to cadmium. *Plant Biology*. 52: 314-320.
- Antonious, G. F.; Silitonga, M. R.; Tsegaye, T. D.; Unrine, J. M.; Coolong, T.; Snyder, J. C. (2013) Elevated concentrations of trace elements in soil do not necessarily reflect metals available to plants. *Environmental Science Health B*. 48 (3):219-225.
- Antweiler, R.C.; Patton, C.J.; Taylor, H.E. (1996) Automated, colorimetric methods for determinations of nitrate plus nitrite, nitrite, ammonium and orthophosphate ions in natural water samples. U.S. Geological Survey SURVEY. Denver, Colorado. (http://wwwbrr.cr.usgs.gov/projects/SW_inorganic/download/NutMethod.pdf, acedido a 26 de Maio de 2016).

- Apel, K.; Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Review Article. *Plant Biology*. 55: 373-99.
- Aravind, P.; Prasad, M. (2005). Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 107-116.
- Arneloti, M.; Montegrossi, G.; Bucciatti, A.; Gonnelli, C., (2008) Determination of organic acids in plants of *Silene paradoxa* L. by HPLC. *Agriculture and Food Chemistry*. 56: 789-795.
- Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and Dissipation of Excess Photons. Review Article. *Plant Physiology*. *Plant Molecular Biology*. 50: 601-39.
- Astolfi, S.; Zuchi, S.; Passera, C. (2005) Effect of cadmium on H⁺ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from roots of different S-supplied maize (*Zea mays* L.) plants. *Plant Science*. 169: 361-368.
- Atkinson, N. R.; Young, S. D.; Tye, A. M.; Breward, N.; Bailey, E. H. (2012) Does returning sites of historic peri-urban waste disposal to vegetable production pose a risk to human health? - A case study near Manchester, UK. *Soil Use and Management*. 28 (4): 559-570.
- Bai, Y.; Gu, C.; Tao, T.; Chen, G.; Shan, Y. (2013) Straw incorporation increases solubility and uptake of cadmium by rice plants. *Acta Agriculturae Scandinavica, B - Soil & Plant Science*. 63 (3): 193-199
- Balbino, L.R. 1968. O método de Egnér Riehm na determinação do fósforo e do potássio assimiláveis em solos de Portugal. *Revista Agronómica*. 51: 46-56.
- Balestrasse, K. B.; Gardey, L.; Gallego, S. M.; Tomaro, M. L. (2001) Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Australian Journal of Plant Physiology*. 28: 497-504.
- Bashir, H.; Ahmad, J.; Bagheri, R.; Nauman, M.; Qureshi, M. I. (2013) Limited sulfur resource forces *Arabidopsis thaliana* to shift towards non-sulfur tolerance under cadmium stress. *Environmental and Experimental Botany*. 94: 19-32
- Bates, L. S.; Waldren, R. P.; Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Short Communication. *Plant and Soil*. 39 (1): 205-207
- Beesley, L.; Inneh, O. S.; Norton, G. J.; Moreno-Jimenez, E.; Pardo, T.; Clemente, R.; Dawson J. J. C. (2014) Assessing the influence of compost and biochar amendments on the

- mobility and toxicity of metals and arsenic in a naturally contaminated mine soil. *Environmental Pollution*. 186 (0):195-202.
- Benavides, M. P.; Gallego, S. M.; Tomaro, M. L. (2005) Cadmium Toxicity in plants. *Toxic Metals in Plants*. 17 (1): 21-34.
- Bingham, F. T.; Page, A. L.; Mahler, R. J.; Ganje, T. J. (1975) Growth and cadmium accumulation of plants grown on a soil treated with a cadmium-enriched sewage sludge. *Environmental Quality*. 4: 207- 211.
- Bolan, N.; Kunhikrishnan, A.; Thangarajan, R.; Kumpiene, J.; Park, J.; Makino, T.; Kirkham, M. B.; Scheckel, K. (2014) Remediation of heavy metal (loid)s contaminated soils – To mobilize or to immobilize? *Hazardous Materials* 266: 141-166.
- Bolanos, L.; Lukaszewski, K.; Bonilla, I.; Blevins, D. (2004). Why boron? Review article. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42 (11): 907- 912.
- Boominathan, R.; Doran, P. M. (2003) Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species. *Journal of Biotechnology*. 101: 131-146.
- Boussen, S.; Soubrand, M.; Bril, H.; Ouerfelli, K.; Abdjeljaouad, S. (2013). Transfer of lead, zinc and cadmium from mine tailings to wheat (*Triticum aestivum*) in carbonated Mediterranean (Northern Tunisia) soils. *Geoderma*. 192: 227-236.
- Bradford, G. R.; Page, A. L.; Lund, L. J.; Olmstead, W. (1975) Trace element concentrations of sewage treatment plant effluents and sludges; their interactions with soils and uptake by plants. *Journal of Environmental Quality*. 4: 123-127.
- Broadley, M. R.; White, P. J.; Hammond, J. P.; Zelko, I.; Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytologist*. 173 (4): 677-702.
- Burzynski, M.; Migocka, M.; Klobus, K. (2005) Cu and Cd transport in cucumber (*Cucumis sativus* L.) root plasma membranes. *Plant Science*. 168: 1609-1614.
- Chen, W.; Li, L.; Chang, A.; Wu, L.; Kwon, S-I; Bottoms, R. (2008) Modeling uptake of cadmium by field-grown lettuce. *Environmental Pollution*. 152: 147-152.
- Choppala, G.; Saifullah; Bolan, N.; Bibi, S.; Iqbal, M.; Rengel, Z.; Kunhikrishnan, A.; Ashwath, N.; Ok, Y.S. (2014) Cellular mechanisms in higher plants governing tolerance to cadmium toxicity. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 33 (5): 374-391.
- Citak, S.; Sonmez, S. (2009) Mineral contents of organically and conventionally grown spinach (*Spinacea oleracea* L.) during two successive seasons. *Agricultural and Food Chemistry*. 57 (17): 7892-7898.

- Citak, S.; Sonmez, S. (2010) Effects of conventional and organic fertilization on spinach (*Spinacea oleracea* L.) growth, yield, vitamin C and nitrate concentration during two successive seasons. *Scientia Horticulturae*. 126: 415- 420.
- Clemens, S. (2006a) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. Review article. *Biochimie*. 88: 1707-1719.
- Clemens, S. (2006b) Evolution and function of phytochelatin synthases. Review article. *Plant Physiology*. 163: 319- 332.
- Clemens, S.; Aarts, M. G. M.; Thomine, S.; Verbruggen, N. (2013) Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends in Plant Science*. 18 (2): 92-99.
- Clemens, S.; Palmgren, M.; Krämer, U. (2002) A long way ahead: Understanding and engineering plant metal accumulation. Review article. *Plant Science*. 7: 1360-1382.
- Cobb, A. (2008) *The Elements – Cadmium*. Marshall Cavendish Corporation. New York. (https://books.google.pt/books?id=tQmTOFclZPsC&printsec=frontcover&dq=Cadmium&hl=en&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false, acedido a 14 de Maio 2016)
- Cuypers, A; Plusquin, M.; Remans, T.; Jozefczak, M.; Keunen, E.; Gielen, H.; Opdenakker, K.; Nair, A.R.; Munters, E.; Artois, T.J.; Nawrot, T.; Vangronsveld, J.; Smeets, K. (2010) Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*. 23: 927- 940.
- Cuypers, A; Smeets, K.; Ruytinx, J.; Opdenakker, K.; Keunen, E.; Remans, T.; Horemans, N.; Vanhoudt, N.; Van Sanden, S.; Van Belleghem, F.; Guisez Y.; Colpaert, J.; Vangronsveld, J. (2011) The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology*. 168: 309- 316.
- Dago, A.; González, I.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J.M.; Esteban, M. (2014) Chemometrics applied to the analysis of induced phytochelatin in *Hordeum vulgare* plants stressed with various toxic non-essential metals and metalloids. *Talanta*. 118: 201- 209.
- DalCorso, G.; Farinati, S.; Furini, A. (2010) Regulatory networks of cadmium stress in plants. Review Article. *Plant Signaling & Behavior*. 5 (6): 663- 667.
- DalCorso, G.; Farinati, S.; Maistri, S.; Furini, A. (2008) How plants cope with cadmium: Staking all on metabolism and gene expression. *Integrative Plant Biology*. 50 (10): 1268-1280.
- DalCorso, G.; Manara, A.; Furini, A. (2013) An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots. The Royal Society of Chemistry. *Metallomics*. 5: 1117- 1132.
- DalCorso, G.; Manara, A.; Piasentin, S.; Furini, A. (2014) Nutrient metal elements in plants. MiniReview. *Metallomics*. 6: 1770-1788.

- Dandan, L.; Dongmei, Z.; Peng, W.; Nanyan, W.; Xiangdong, Z. (2011) Subcellular Cd distribution and its correlation with antioxidant enzymatic activities in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74: 874-881.
- Davis, R. D.; Carlton-Smith, C. (1980) *Crops as Indicators of the Significance of Contamination of Soils by Heavy Metals*. Water Research Centre. Stevenage, London.
- De la Rosa, G.; Martinez-Martinez, A.; Pelayo, H.; Peralta-Videa, J. R.; Sanchez-Salcido, B.; Gardea-Torresdey, J. L. (2005) Production of low-molecular weight thiols as a response to cadmium uptake by tumbleweed (*Salsola kali*). *Plant Physiology and Biochemistry*. 43 (5): 491-498
- De la Rosa, G.; Peralta-Videa, J. R.; Montes, M.; Parsons, J. G.; Cano-Aguilera, I.; Gardea-Torresdey, J. L. (2004) Cadmium uptake and translocation in tumbleweed (*Salsola kali*), a potential Cd-hyperaccumulator desert plant species: ICP/OES and XAS studies. *Chemosphere*. 55 (9):1159-1168.
- Decreto-Lei n.º 103/2015 de 15 de Junho. Diário da Republica nº 114 - 1ª Série – Ministério da Economia, Lisboa.
- Decreto-Lei n.º 118/2006 de 21 de Junho. Diário da República nº 118 – 1ª Série A – Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional, Lisboa.
- Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto. Diário da Republica n.º 176 - 1ª Série A – Ministério do Ambiente, Lisboa.
- Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto. Diário da Republica n.º 164 - 1ª Série – Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional, Lisboa.
- Decreto-Lei n.º 83/2011 de 20 de Junho. Diário da Republica n.º 117 – 1ª Série – Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, Lisboa.
- Demiral, T.; Turkan, I. (2005) Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 53 (3): 247-257.
- Demirevska-Kepova, K.; Simova-Stoilova, L.; Stoyanova, Z.P.; Feller, U.; (2006) Cadmium stress in barley: Growth, leaf pigment, and protein composition and detoxification of reactive oxygen species. *Plant Nutrition*. 29: 451-468.
- Ederli, L.; Reale, L.; Ferranti, F.; Pasqualini, S. (2004) Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. *Physiology Plant*. 121: 66-74.
- EFSA (2009a) Cadmium in food - Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain, *The EFSA Journal* (2009). 980: 1-139.

- EFSA (2009b) Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on cadmium in food. The EFSA Journal. 980: 1-139.
- EFSA 2012; Cadmium dietary exposure in the European population European Food Safety Authority. The EFSA Journal. 10 (1): 2551- 2588.
- Ekmekci, Y., Tanyolac, D.; Ayhan B. (2008) Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. Plant Physiology. 165: 600-611.
- Ellman, G. (1959) Tissue sulfhydryl groups. Archives. Biochemistry Biophysics. 82: 70- 77.
- Esteban, R.; Moran, J.F.; Becerril, J.M. & García-Plazaola, J.I. (2015) Versatility of carotenoids: An integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interations. Environmental and Experimental Botany. 119: 63-75.
- European Comission – JRC 2016 (<http://esdac.jrc.ec.europa.eu/content/heavy-metals-topsoils#tabs-0-description=1>, acedido a 10 Abril 2016).
- Evangelou, M. W. H.; Daghan, H.; Schaeffer, A. (2004) The influence of humic acids on the phytoextraction of cadmium from soil. Chemosphere. 57 (3): 207-213.
- Fangueiro, D.; Coutinho, J.; Cabral, F.; Fidalgo, P.; Bol, R. & Trindade, H. (2012) Nitric oxide and greenhouse emissions follwing the application of different cattle slurry particle size fractions to soil. Atmospheric Environment. 47: 373- 380.
- FAO (2015) Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT database (<http://faostat3.fao.org/home/E>, acedido a 4 de Abril de 2016.
- Fernández, R.; Bertrand, A.; García Alonso, J. I.; Tames, R.S. & González, A. (2012) Lead accumulation and synthesis of non-protein thiotic peptides in selected clones of *Melilotus alba* and *Melilotus officinalis*. Environmental and Experimental Botany. 78: 18-24.
- Fernández, R.; Bertrand, A.; Reis, R.; Mourato, M. P.; Martins, L. L.; González, A. (2013a) Growth and physiological responses to cadmium stress of two populations of *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter. Hazardous Materials. 244-245 (0): 555-562.
- Fernández, R.; Fernández-Fuego, D.; Bertrand, A.; González, A. (2014). Strategies for Cd accumulation in *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter: Role of the cell wall, non-protein thiols and organic acids. Plant Physiology and Biochemistry. 78: 63-70.
- Fernández, R.; Fernández-Fuego, D.; Rodríguez-González, P.; García Alonso, J. I.; Bertrand, A. & González, A. (2013b) Cd-induced phytochelatin synthesis in *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter is determined by the dilution of the culture medium. Environmental Science and Pollution Research. 21 (2): 1133-1145.

- Fernández-Genito, A.P.; Duarte, A.C. (2015) Soil management guidelines in Spain and Portugal related to EU Soil Protection Strategy based on analysis of soil databases. *Catena*. 126: 146- 154.
- Flora Ibérica (2016) Illustrations of *Spinacia oleracea* L.
(<http://www.floraiberica.es/eng/PHP/iconos.php?gen=Spinacia&espe=&infra=&familia=Chenopodiaceae&autabre=L.>, acedido a 26 Fevereiro 2016).
- Foyer, C.H.; Gomez, L.D.; van Heerden, P.D.R. (2005) "Glutathione" em Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. Ed. Sminorff, N.; Black Well Publishing. Reino Unido.
- Foyer, C.H.; Noctor, G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*. 17: 1866 - 1875.
- Gajewska, E.; Niewiadomskab, E.; Tokarz, K.; Słabad, M.; Skłodowska, M. (2013) Nickel-induced changes in carbon metabolism in wheat shoots. *Plant Physiology* 170: 369- 377.
- Gajewska, E.; Skłodowska, M.; Słaba, M. & Mazur, J. (2006) Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum*. 50 (4): 653- 659.
- Gallego, S. M.; Pena, L. B.; Barcia, R. A.; Azpilicueta, C. E.; Lannone, M. F.; Rosales, E. P.; Zawoznik, M. S.; Groppa, M. D.; Benavides, M. P. (2012) Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*. 83: 33-46.
- Ghnayaa, T.; Nouairib, I.; Slamaa, I.; Messedia, D.; Grignonc, C.; Abdellya, C.; Ghorbeld, M.H. (2005) Cadmium effects on growth and mineral nutrition of two halophytes: *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology*. 162: 1133- 1140.
- Godt, J.; Scheidig, F.; Grosse-Siestrup, C.; Esche, V.; Brandenburg, P.; Reich, A.; Groneberg, D.A. (2006) The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Occupational Medicine and Toxicology*. 1: 22.
- Gorinova, N.; Nedkovska, M.; Todorovska, E.; Simova-Stoilova, L.; Stoyanova, Z.; Georgieva, K.; Demirevska-Kepova, K.; Atanassov, A. & Herzig, R. (2007) Improved phytoaccumulation of cadmium by genetically modified tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). Physiological and biochemical response of the transformants to cadmium toxicity. *Environmental Pollution*. 145: 161-170.

- Greenwood, N.N.; Earnshaw, A. (2005) Chemistry of the elements. 2ª Edição. Elsevier. Burlington. MA.
- Gupta, S.D. (2011) Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants. CRC Press Taylor & Francis Group. Nova Iorque. EUA.
- Hall, J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Review article. *Experimental Botany*. 53 (366): 1- 11.
- Han, F.; Shan, X.; Zhang, S.; Wen, B. & Owens, G. (2006) Enhanced cadmium accumulation in maize roots—the impact of organic acids. *Plant Soil*. 289: 355-368.
- Harris, D.C. (2010) Quantitative Chemical Analysis. 8ª Edição. W.H. Freeman and Company. Nova Iorque. EUA.
- Hart, J. J.; Welch, R. M.; Norvell, W. A.; Sullivan, L.A. & Kochian, L. V. (1998) Characterization of Cadmium Binding, Uptake, and Translocation in Intact Seedlings of Bread and Durum Wheat Cultivars. *Plant Physiology*. 116: 1413-1420.
- Hasanuzzaman, M.; Nahar, K.; Alam, M.M.; Fujita, M. (2013) “Adverse Effects of Cadmium on Plants and Possible Mitigation of Cadmium-Induced Phytotoxicity” Capítulo 1 em *Cadmium: Characteristics, Sources of Exposure, Health and Environmental Effects*. Ed. Mirza Hasanuzzaman & Masayuki Fujita. Nova Science Publishers, Inc. Nova Iorque. EUA.
- Hassan, Z.; Aarts, M. (2011) Opportunities and feasibilities for biotechnological improvement of Zn, Cd or Ni tolerance and accumulation in plants. *Environmental and Experimental Botany*. 72: 53- 63.
- Hawkesford, M.J.; de Kok, L.J. (2006) Managing sulphur metabolism in plants. *Plant, Cell and Environment*. 29: 382-395.
- Hawrylak-Nowak, B.; Dresler, S.; Wójcik, M. (2014) Selenium affects physiological parameters and phytochelatins accumulation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants grown under cadmium exposure. *Science Horticulture*. 172: 10- 18.
- Hernandez-Soriano, M. C.; Jimenez-Lopez, J. C. (2012) Effects of soil water content and organic matter addition on the speciation and bioavailability of heavy metals. *Science of the Total Environment*. 423: 55-61.
- Hirschi, K. D. (2004). The calcium conundrum. Both versatile nutrient and specific signal. *Plant Physiology*. 136 (1): 2438- 2442.
- Houba, V.J.G.; Van der Lee, J.J. and Novozamsky, I. (1995) Soil Analysis Procedures – Other Procedures. Parte 5B. Ed. Wageningen Agricultural University. Holanda.

- Huang, G.Y.; Wang, Y.S. (2010) Physiological and biochemical responses in the leaves of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*) exposed to multiple heavy metals. *Hazardous Materials*. 182: 848-854.
- Inaba, S.; C. Takenaka (2005) Effects of dissolved organic matter on toxicity and bioavailability of copper for lettuce sprouts. *Environment International*. 31 (4): 603- 608.
- Irfan, M.; Hayat, S.; Ahmad, A.; Alyemeni, M.N. (2013) Soil cadmium enrichment: Allocation and plant physiological manifestations. *Review. Biological Sciences*. 20: 1-10.
- Jomava, K.; Valko, M. (2013) Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. Mini-Review article. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 70: 102-110.
- Jozefczak, M.; Remans, T.; Vangronsveld, J.; Cuypers, A. (2012). Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses. *International Journal of Molecular Sciences*. 13 (3): 3145-3175.
- Kaiser N.B.; Gridley, K.L.; Brady, J.N.; Phillips, T.; Tyerman, S.D. (2005) The Role of Molybdenum in Agricultural Plant Production. *An. Bo*. 95 (5): 745.-754.
- Keunen, E.; Remans, T.; Bohler, S.; Vangronsveld, J.; Cuypers, A. (2011) Metal-Induced Oxidative Stress and Plant Mitochondria. *Review Article. International Journal of Molecular Sciences*. 12: 6894-6918.
- Khan, M. I. R.; Nazir, F.; Asgher, M.; Per, T. S.; Khan, N. A. (2015) Selenium and sulfur influence ethylene formation and alleviate cadmium-induced oxidative stress by improving proline and glutathione production in wheat. *Plant Physiology*. 173: 9-18.
- Klassen, C.D.; Liu, J.; Diwan, B.A. (2009) Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Pharmacology*. 238: 215-220.
- Kobayashi, T.; Nishizawa, N.K. (2012) Iron Uptake, Translocation, and Regulation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology*. 63: 131-152.
- Krämer, U. (2010) Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annual Review. Plant Biology*. 61: 517-534.
- Kuboi, T.; Noguchi, A.; Yazaki, J. (1986) Family – dependent cadmium accumulation characteristics in higher plants. *Plant Soil*. 92: 405- 415
- Lefèvre, I.; Marchal, G.; Ghanem, M.E.; Correia, E.; Lutts, S. (2010) Cadmium has contrasting effects on polyethylene glycol – Sensitive and resistant cell lines in the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus* L.. *Plant Physiology*. 167: 365- 374.

- Li, P.; Wang, X.; Zhang, T.; Zhou, D.; He, Y. (2008) Effects of several amendments on rice growth and uptake of copper and cadmium from a contaminated soil. *Environmental Sciences* 20: 449- 455.
- Li, X.; Yang, Y.; Jia, L.; Chen, H.; Wei, X. (2012) Zinc-induced oxidative damage, antioxidant enzyme response and proline metabolism in roots and leaves of wheat plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 89:150-157.
- Liang, Z.; Ding, Q.; Wei, Li, J.D.; Chen, S.; Ma, Y. (2013) Major control ling factors and predictions for cadmium transfer from the soil in to spinach plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 93: 180-185.
- Lichtenthaler, H. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes- Methods Enzymol. *Physiol Plant*. 148: 350-382. (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142913.faf0403s01/abstract;jsessionid=D9841402E571923D7CB5581CE95D1020.f02t02?userIsAuthenticated=false&deniedAccessCustomisedMessage>, acedido a 6 de Abril de 2016).
- Lichtenthaler, H.K.; Buschmann, C. (2001) "Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy", em *Current protocols in food analytical chemistry*. Wiley, Nova Iorque. EUA.
- Liu, L.; Chen, H.; Cai, P.; Liang, W.; Huang, Q. (2009) Immobilization and phytotoxicity of Cd in contaminated soil amended with chicken manure compost. *Hazardous Materials*. 163 (2): 563-567.
- López-Millán, A.F.; Sagardoy, R.; Solanas, M.; Abadía, A.; Abadía, J. (2009) Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. *Environmental and Experimental Botany*. 65 (2): 376-385.
- Loscos, J.; Matamoros, M.A.; Becana, M. (2008) Ascorbate and homoglutathione metabolism in common bean nodules under stress conditions and during natural senescence. *Plant Physiology*. 146: 1282-1292.
- Maksymiec, W. (1997) Effect of copper on cellular processes in higher plants. Review article. *Photosynthetica*. 34 (3): 321-342.
- Marchiol, L.; Sacco, P.; Assolari, S.; Zerbi, G. (2004) Reclamation of polluted soil: Phytoremediation potential of crop-related Brassica species. *Water Air and Soil Pollution*. 158 (1): 345-356.
- Marques, M.C.; Nascimento, C.W.A. (2013) Analysis of chlorophyll fluorescence spectra for the monitoring of Cd toxicity in a bio-energy crop (*Jatropha curcas*). *Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 127: 88-93.

- Martínez-Peñalver, A.; Graña, E.; Reigosa, M.J. & Sánchez-Moreiras, A.M. (2012) The early response of *Arabidopsis thaliana* to cadmium- and copper-induced stress. *Environmental and Experimental Botany*. 78: 1-9.
- Martins, L.L.; Mourato, M. P.; Cardose, A.I.; Pinto, A.P.; Mota, A.M.; Gonçalves, M.L.S. & Vraennes, A (2010) Oxidative stress induced by cadmium in *Nicotiana tabacum* L.: effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts. *Acta Physiol Plant*. 33 (4): 1375-1383.
- Martins, L.L.; Reis, R.; Moreira, I.; Pinto, F.; Sales, J.; Mourato, M. (2013) "Antioxidative Response of plants to oxidative stress induced by cadmium" Capítulo 3, em *Cadmium: Characteristics, Sources of Exposure, Health and Environmental Effects*. Ed. Mirza Hasanuzzaman & Masayuki Fujita. Nova Science Publishers, Inc. Nova Iorque. EUA.
- Mendes, B.; Oliveira, J. F. (2004) *Qualidade da água para consumo humano*. ed Lidel. Lousã, Portugal.
- Mengel, K. (2007) "Potassium" em *Handbook of Plant Nutrition*. Barker, A. V.; Pilbeam, D. J. Ed, Boca Raton, FL, EUA. CRC Press.
- Michalska, M.; Asp, H. (2001) Influence of lead and cadmium on growth, heavy metal uptake, and nutrient concentration of three lettuce cultivars grown in hydroponic culture. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* .32 (3): 571-583.
- Millaleo, R.; Reyes-Diaz, M.; Ivanov, A.G.; Mora, M.L.; Alberdi, M. (2010) Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *Soil Science Plant Nutrition*. 10 (4): 470-481.
- Mithöfer, A.; Schulze, B.; Boland, W. (2004) Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters*. 566 (1): 1-5.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Review Article. *Plant Science*. 7 (9): 405-410.
- Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Suzuki, N.; Miller, G.; Tognetti, V. B.; Vandepoele, k.; Gollery, M.; Shulaev, V.; Breusege, F. V. (2011) ROS signaling: the new wave?. Review. *Plant Science*. 16 (6): 300-309.
- Mittler, R.; Vanderauwera, Gollery, S.M.; Breusegem, F.V. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Abiotic stress series. Plant Science*. 9: 490- 498.
- Mobin, M.; Khan, N. A. (2007) Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Plant Physiology* 164: 601-610.

- Mohamed, A.A.; Castagna, A.; Ranieri, A.; Sanità di Toppi, L. (2012) Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*. 57: 15-22.
- Mohamed, I.; Ahamadou, B.; Li, M.; Gong, C.; Cai, P.; Liang, W.; Huang, Q. (2010) Fractionation of copper and cadmium and their binding with soil organic matter in a contaminated soil amended with organic materials. *Soils and Sediments* 10 (6): 973-982.
- Møller, I. M.; Jensen, P.E.; Hansson, A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. Review Article. *Plant Biological*. 58: 459-81.
- Molnárová, M. & Fargasová, A., 2012. Relationship between physiological and biochemical parameters activated by cadmium in *Sinapis alba* L. and *Hordeum vulgare* L.. *Ecological Engeneering*. 49: 65-72.
- Moreira, I.M.; Mourato, M.P.; Reis, R.; Martins, L.L. (2015) Oxidative Stress Induced by Cadmium and Copper in *Brassica rapa* Leaves: Indicators of Stress, Oxidative Damage, and Antioxidant Mechanisms. *Soil Science and Plant Analysis*. 46: 2475- 2489
- Morelock, T. E.; Correll, C.J. (2008) "Spinach" em Vegetables I. Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae. *Handbook of plant breeding*, Prohens, J.; Nuez F.Ed. Springer. EUA.
- Mourato, M., R. Reis, & L. Martins (2012) Characterization of Plant Antioxidative System in Response to Abiotic Stresses: A Focus on Heavy Metal Toxicity. In *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*, eds. G. Montanaro and B. Dichio, 23-44. Rijeka: Intech.
- Mourato, M.P.; Martins, L.L.; Campos-Andrada, M.P. (2009) Physiological responses of *Lupinus luteus* to different copper concentrations. *Biologia Plantarum*. 53 (1): 105-111.
- Mourato, M.P.; Moreira, I.; Leitão, I., Pinto, F., Sales, J.; Martins, L.L. (2015) Effect of heavy metals in plants of genus *Brassica*. *International Journal of Molecular Sciences*. 16 (8): 17975-17998.
- Mulligan, C. N.; Yong, R. N.; Gibbs, B. F. (2001) Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*. 60 (1): 193-207.
- Nagajyoti, P.; Lee, K.; Sreekanth, T. (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 8 (3): 199-216.
- Najmanova, J.; Neumannovaa, E.; Leonhardta, t.; Zitkab, O.; Kizekb, R.; Macekc, T.; Mackovaa, M.; Kotrbaa, P. (2012) Cadmium-induced production of phytochelatin and

- speciation of intracellular cadmium in organs of *Linum usitatissimum* seedlings. *Industrial Crops and Products*. 36: 536-542.
- Narwal, R. P.; Singh, B. R. (1998) Effect of Organic Materials on Partitioning, Extractability and Plant Uptake of Metals in an Alum Shale Soil. *Water, Air, and Soil Pollution*. 103 (1-4): 405-421.
- Navrot, N.; Rouhier, N.; Gelhaye, E.; Jacquot, J.P. (2007) Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*. 129: 185-195.
- Nedjimi, B.; Daoud, Y., (2009) Cadmium accumulation in *Atriplex halimus* subsp. *shweinfurthii* and its influence on growth, proline, root hydraulic conductivity and nutrient uptake. *Flora*. 204: 316-324.
- Neilson, S.; Rajakaruna, N. (2015) "Phytoremediation of Agricultural Soils: Using Plants to Clean Metal-Contaminated Arable Land" em *Phytoremediation*, Ed. Ansari, A. A.; Gill, S. S.; Gill, R.; Lanza, G. R.; Newman, I., Springer International Publishing.
- Nishihara, E.; Inoue, M.; Kondo, K.; Takahashi, K.; Nakata, N. (2001) Spinach yield and nutritional quality affected by controlled soil water matric head. *Agricultural water management*. 51: 217-229.
- Nocito, F.; Pirovano, L.; Cocucci, M.; Sacchi, G. (2002) Cadmium-induced sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiology*. 129: 1872-1879.
- Nordberg, M.; Nordberg, G.F. (2002) em Sarkar, B. Ed. *Handbook of Heavy Metals in the Environment*. Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque.
- Nouairi, I.; Ammar, W.B.; Youssef, N.B.; Miled, D.D.B.; Ghorbal, M.H.; Zarrouk, M. (2009) Antioxidant defense system in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) and rape (*Brassica napus*) under cadmium stress. 31: 237- 247.
- OMS (2010) Exposure to Cadmium: A Major Public Health Concern. Preventing Disease Through Reverting Disease Through Healthy Environments. (http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/cadmium/en/, aceso a: 16 de Março de 2016).
- OMS (2013) Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series 983. Seventy-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome , Itlay. (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/98388/1/9789241209830_eng.pdf?ua=1, aceso a: 4 de Janeiro de 2016).

- Oven, M.; Page, J.; Zenk, M.; Kutchan, T. (2002) Molecular Characterization of the Homophytochelatase of Soybean Glycine max. *Biological Chemistry*. 277: 4747-4754.
- Ozyigit, I.I.; Vardar, F.; Yasar, U.; Akinci, S. (2013) Long-Term Effects of Aluminum and Cadmium on Growth, Leaf Anatomy, and Photosynthetic Pigments of Cotton. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 44: 3076- 3091.
- Pan, J.; Plant, J.A.; Voulvoulis, N.; Oates, C.J.; Ihlenfeld, C. (2010) Cadmium levels in Europe: implications for human health. *Environmental Geochemistry Health*. 32: 1- 12.
- Park, J.; Song, W.-Y.; Ko, D.; Eom, Y.; Hansen, T.H.; Schiller, M.; Lee, T.G.; Martinoia, E. & Lee, Y. (2011) The phytochelatase transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *The Plant Journal*. 69 (2): 278- 288.
- Passaia, G.; Margis-Pinheiro, M. (2015) Glutathione peroxidases as redox sensor proteins in plant cells. *Plant Science*. 234: 22-26.
- Peralta-Videa, J.R.; Lopez, M. L.; Narayan, M.; Saupe, G.; Gardea-Torresdey, J. (2009) The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 41: 1665-1677.
- Pilon-Smits, E. (2005) Phytoremediation. *Annual Review Plant Biology*: 56 (1): 15-39.
- Pinto, A. P.; Mota, A. M.; Varennes, A.; Pinto, F. C. (2004) Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Science of the Total Environment*. 326: 239-247.
- Pinto, F. R.; Mourato, M. P.; Sales, J. R.; Moreira, I. N.; Martins, L. L. (2016) Oxidative stress response in spinach plants induced by Cadmium. *Plant Nutrition*. In press.
- Polec-Pawlak, K.; Ruzik, R.; Lipiec, E. (2007) Investigation of Cd(II), Pb(II) and Cu(I) complexation by glutathione and its component amino acids by ESI-MS and size exclusion chromatography coupled to ICP-MS and ESI-MS. *Talanta*. 72: 1564-1572.
- Potters, G.; De Gara, L.; Asard, H.; Horemans, N. (2002) Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol Biochem*. 40: 537-548.
- Prasad, M. N. V. (2004) Heavy Metal Stress in Plants. From Biomolecules to Ecosystems. 2^a Edição. Springer. Berlim, Alemanha.
- Prüss-Ustün, A.; Wolf, J.; Corvalán, C.; Bos, R.; Neira, M. (2016) PREVENTING DISEASE THROUGH HEALTHY ENVIRONMENTS - A global assessment of the burden of disease from environmental risks. WHO Library (ISBN 978 92 4 156519 6).

Pub Chem – Open Chemistry Database.

(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4369188#section=Top>, acedido a 3 de Maio de 2016).

Quelhas dos Santos, J. (2012) Fertilização. Fundamentos da utilização dos adubos e corretivos. 4ª Edição. Publicações Europa-América. Lousã. Portugal.

Quezada-Hinojosa, R.; Föllmi, K.B.; Gillet, F.; Matera, V. (2015) Cadmium accumulation in six common plant species associated with soils containing high geogenic cadmium concentrations at Le Gurnigel, Swiss Jura Mountains. *Catena*. 124: 85-96.

Ramalho, J.; Pons, T.; Groeneveld, H.; Nunes, M. (1997) Photosynthetic responses of *Coffea arabica* leaves to a short-term high light exposures in relation to N availability. *Physiologia Plantarum*. 101: 229-239.

Rao, K. V.; Sresty, T. V. (2000) Antioxidant parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science*. Elsevier. 157 (1): 113-128.

Rascio, N.; Navari-Izzo, F. (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting?. *Plant Science*. 180: 169-181.

Redondo-Gómez, S.; Mateos-Naranjo, E.; Andrades-Moreno, L. (2010) Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in a halophytic Cd-hyperaccumulator, *Arthrocnemum macrostachyum*. *Hazardous Materials*. 184: 299-307.

Regulamento (CE) n.º 629/2008 de 2 de Julho de 2008 que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, 2008).

Rhoads, D.M.; Umbach, A.L.; Subbaiah, C.C.; Siedow, J.N. (2006) Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar Signaling. *Plant Physiology*. 141: 357-366.

Ribeiro, E.P.; Seravalli, E.A.G. (2007) Química de alimentos. Ed. Blucher. São Paulo. Brasil.

Rodrigues, S.M.; Henriques, B.; Ferreira da Silva, E.; Pereira, M.E.; Duarte, A.C. & Römken, P.F.A.M. (2010) Evaluation of an approach for the characterization of reactive and available pools of twenty potentially toxic elements in soils: parte I — the role of key soil properties in the variation of contaminants' reactivity. *Chemosphere*. 81: 1549-1559.

Roychoudhury, A.; Basu, S. & Sengupta, D.N. (2012) Antioxidants and stress-related metabolites in the seedlings of two indica rice varieties exposed to cadmium chloride toxicity. *Acta Physiol Plant*. 34: 835-847.

- Rubio, M.C.; Gonzalez, E.M.; Minchin, F.R.; Webb, K.J.; Arrese-Igor, C.; Ramos, J.; Becana M. (2002). Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiologia Plantarum*. 115: 531-540.
- Sandálio, L. M.; Dalurzo, H. C.; Gomez, M.; Romero-Puertas, M. C.; del Rio, L. A. (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*. 52: 21215-21265.
- Sánita di Toppi, L.; Gabbrielli, R. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*. 41: 105-130.
- Saraswat, S.; Rai, J. P. N. (2011). Complexation and detoxification of Zn and Cd in metal accumulating plants. Review. *Environmental Science and Biotechnology*. 10: 327-339.
- Schachtman, D.P.; Reid, R. J.; Ayling, S.M. (1998) Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell Daniel. *Plant Physiology*. 116: 447-453
- Schollenberger, C.J.; Simon, R.H. (1945) Determination of Exchange capacity and exchangeable bases in soil-amonium acetate Method. *Soil Science*. 59: 13-24.
- Schutzendubel, A.; Schwanz, P.; Teichmann, T.; Gross, K.; Langenfeld-Heyser, R.; Godbold, D.L.; Polle, A. (2001) Cadmium-Induced Changes in Antioxidative Systems, Hydrogen Peroxide Content, and Differentiation in Scots Pine Roots. *Plant Physiol*. 127: 887-898.
- Serrano, N.; Díaz-Cruz, J.M.; Ariño, C.; Esteban, M. (2015) Recent contributions to the study of phytochelatinases with an analytical approach. *Analytical Chemistry*. 73: 129 - 145.
- Seth, C. S.; Remans, T.; Keunen, E.; Jozefczak, M.; Gielen, H.; Opdenakker, K.; Weyens, N.; Vangronsveld, J.; Cuypers, A. (2012) Phytoextraction of toxic metals: a central role for glutathione. *Plant Cell and Environment*. 35 (2): 334-346.
- Seth, C.; Misra, V.; Chauhan, L.; Singh, R. (2008) Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71: 711-716.
- Shanker, A. K.; Djanaguiraman, M.; Sudhagar, R.; Chandrashekar, C. N.; Pathmanabhan, G. (2004) Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek. cv CO 4) roots. *Plant Science*. 166 (4): 1035-1043.
- Sharma, P.; Dubey, R. S. (2004) Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Science*. 167 (3): 541-550.

- Shaul, O. (2002) Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *BioMetals* 15: 309- 323.
- Sherameti, I.; Varma, A. (2010) Soil biology. Soil Heavy Metals. Springer. Nova York.
- Shokrzadeh ,M.; Shokravie, M.; Ebadi, A.G.; Babee, Z.; Tarighati, A. (2007) The measurement of nitrate and nitrite content in leek and spinach sampled from central cities of Mazandaran state of Iran. *World Applied Sciences Journal*. 2 (2): 121-124.
- Sims, D. A.; Gamon, J. A. (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment*. 81: 337-354.
- Singh, N.; Ma, L. Q.; Srivastava, M.; Rathinasabapathi, B. (2006) Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science*. 170: 274-282.
- Singh, S.; Prasad, S.M. (2014) Growth, photosynthesis and oxidative responses of *Solanum melongena* L. seedlings to cadmium stress: Mechanism of toxicity amelioration by kinetin. *Scientia Horticulturae*. 176: 1-10
- Sinha, S.; Mallick, S.; Misra, R. K.; Singh, S.; Basant, A.; Gupta, A. K. (2007) Uptake and translocation of metals in *Spinacia oleracea* L. grown on tannery sludge-amended and contaminated soils: Effect on lipid peroxidation, morpho-anatomical changes and antioxidants. *Chemosphere* 67 (1): 176-187.
- Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J. (2007) Principles of Instrumental Analysis. 6ª edição, Saunders College Publishing, New York, USA.
- Smeets, K.; Cuypers, A.; Lambrechts, A.; Semane, B.; Hoet, P.; Van Laere, A.; Vangronsveld, J. (2005) Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiology Biochemistry*. 43: 437-444.
- Smeets, K.; Opdenakker, K.; Remans, T.; Van Sanden, S.; Van Belleghem, F.; Semane, B.; Horemans, N.; Guisez, Y.; Vangronsveld, J.; Cuypers, A. (2009) Oxidative stress-related responses at transcriptional and enzymatic levels after exposure to Cd or Cu in a multipollution context. *Plant Physiology*. 166: 1982-1992.
- Sminorff, N. (2005) "Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway and functions" em *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Ed. Sminorff, N.; Black Well Publishing. Reino Unido.

- Smolders, E.; Mertens, J. (2013) "Cadmium" em Heavy Metals in Soils. Trace Metals and their Bioavailability. Ed. Alloway, B.J.; 3ª Edição. Springer. Environmental Pollution. Nova Iorque, EUA.
- Sun, R.; Zhou, Q.; Wei, S. (2011) Cadmium Accumulation in Relation to Organic Acids and Nonprotein Thiols in Leaves of the Recently Found Cd Hyperaccumulator *Rorippa globosa* and the Cd-accumulating Plant *Rorippa islandica*. *Plant Growth Regul.* 30: 83-91.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2002) *Plant Physiology*. 3ª Edição. Sinauer. Sunderland. EUA.
- Valpuesta, V.; Botella, M.A. (2004) Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends Plant Science*. 9: 573-577.
- Varenes, A. (2003) *Produtividade dos Solos e Ambiente*. Escolar (Ed.). Lisboa.
- Verkleij, J.A.C.; Golan-Goldhirsh, A.; Antosiewicz, D.A.; Schwitzguébel, J.P.; Schröder, P. (2009) Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. Review article.
- WebElements (2016) (<http://www.webelements.com/cadmium/isotopes.html>; acessado a 4 de abril de 2016).
- White, P. J.; Brown, P. H. (2010) Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany*. 105: 1073-1080.
- Wójcik, M.; Skórzyńska-Polit, E.; Tukiendorf, A. (2006) Organic acids accumulation and antioxidant enzyme activities in *Thlaspi caerulescens* under Zn and Cd stress. *Plant Growth Regulation*. 48: 145-155.
- Wood, B. A.; Feldmann, J. (2012) Quantification of phytochelatins and their metal(loid) complexes: critical assessment of current analytical methodology. Review Article. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 402: 3299-3309.
- Yannarelli, G.G.; Fernández-Alvarez, A.J.; Santa-Cruz, D.M.; Tomaro, M.L. (2007) Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry*. 68: 505-512.
- Zhang, Y. (2013) "Biological role of ascorbate in plants" In Zhang, Y. *Ascorbic acid in plants - Biosynthesis, regulation and enhancement*. Ed. Springer: Wuhan, Hubei, China.

Anexos

Tabela A1- Curva de calibração para cada elemento determinado por EAA em chama, padrões em mg L⁻¹, ou em grafite. Alguns padrões necessitam da adição de interferentes de cloreto de estrôncio (SrCl₂) ou de cloreto de cério (CsCl₂).

Elemento	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5	Adição de Interferente
Ca	2,00	4,00	10,0	20,0	-	2 % de SrCl ₂
Mg	0,20	0,40	1,00	2,00	-	
Na	0,20	0,40	1,00	2,00	-	2 % de CsCl ₂
K	0,50	1,00	2,50	5,00	-	
Fe	2,00	4,00	8,00	12,0	-	-
Cu	0,25	0,50	1,00	2,00	-	-
Zn	0,50	1,00	2,00	4,00	-	-
Mn	1,50	3,00	6,00	12,0	-	-
Pb	2,00	4,00	10,0	20,0	-	-
Ni	0,40	0,80	1,50	2,50	4,00	-
Cd	0,20	0,40	0,80	1,50	3,00	-
Cd – grafite (µg L ⁻¹)	0,50	1,50	4,00	8,00	12,0	-

Figura A1 - Imagens do ensaio do capítulo IV, plantas jovens ao 6º dia de exposição (régua ≈ 40 cm).

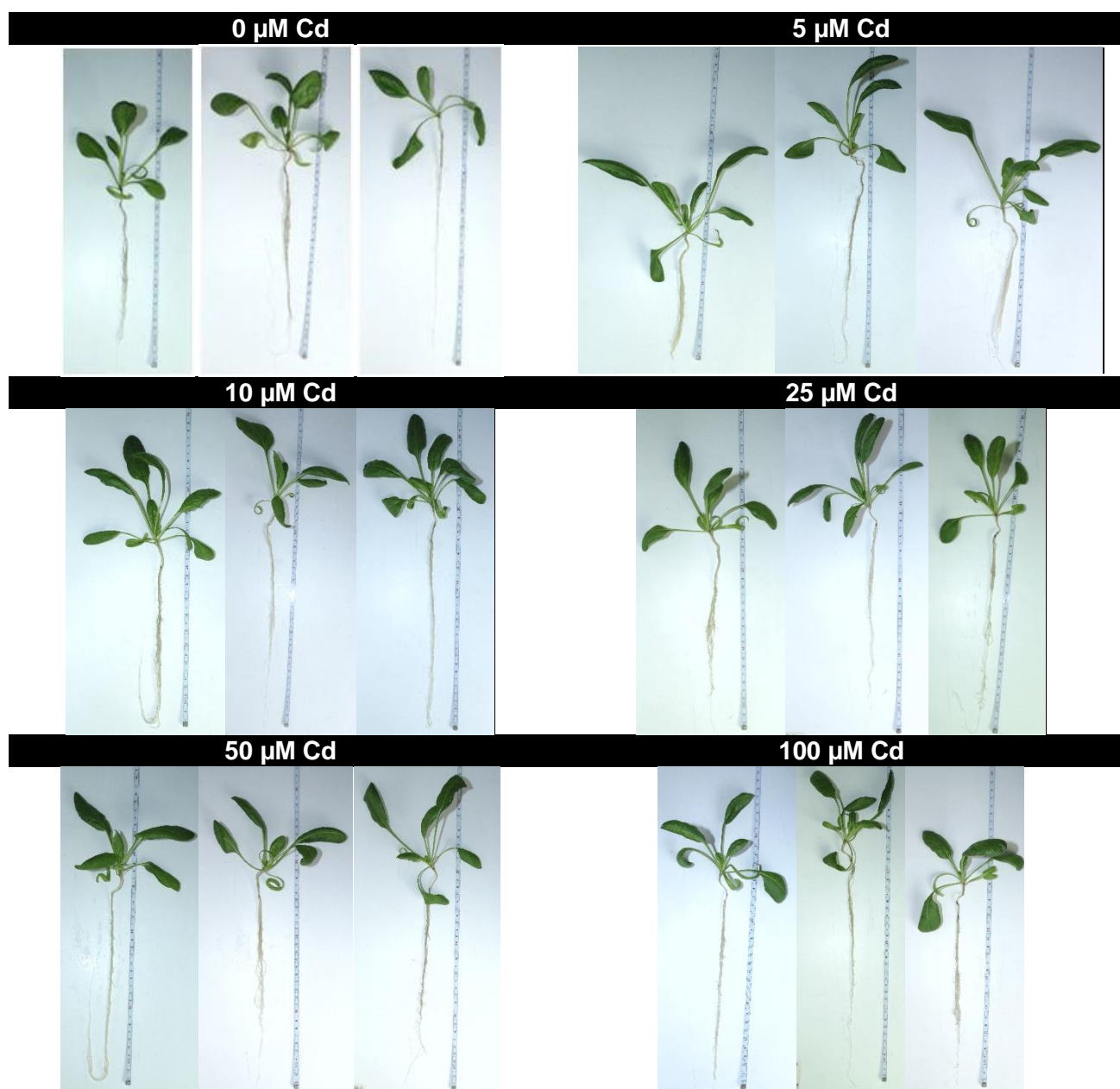


Figura A2 - Imagens do ensaio do capítulo IV, plantas jovens ao 21º dia de exposição (régua ≈ 60 cm, para 0 e 5 μM Cd; ≈50 cm para 10, 25 e 50 μM Cd; ≈40 cm para 100 μM Cd).

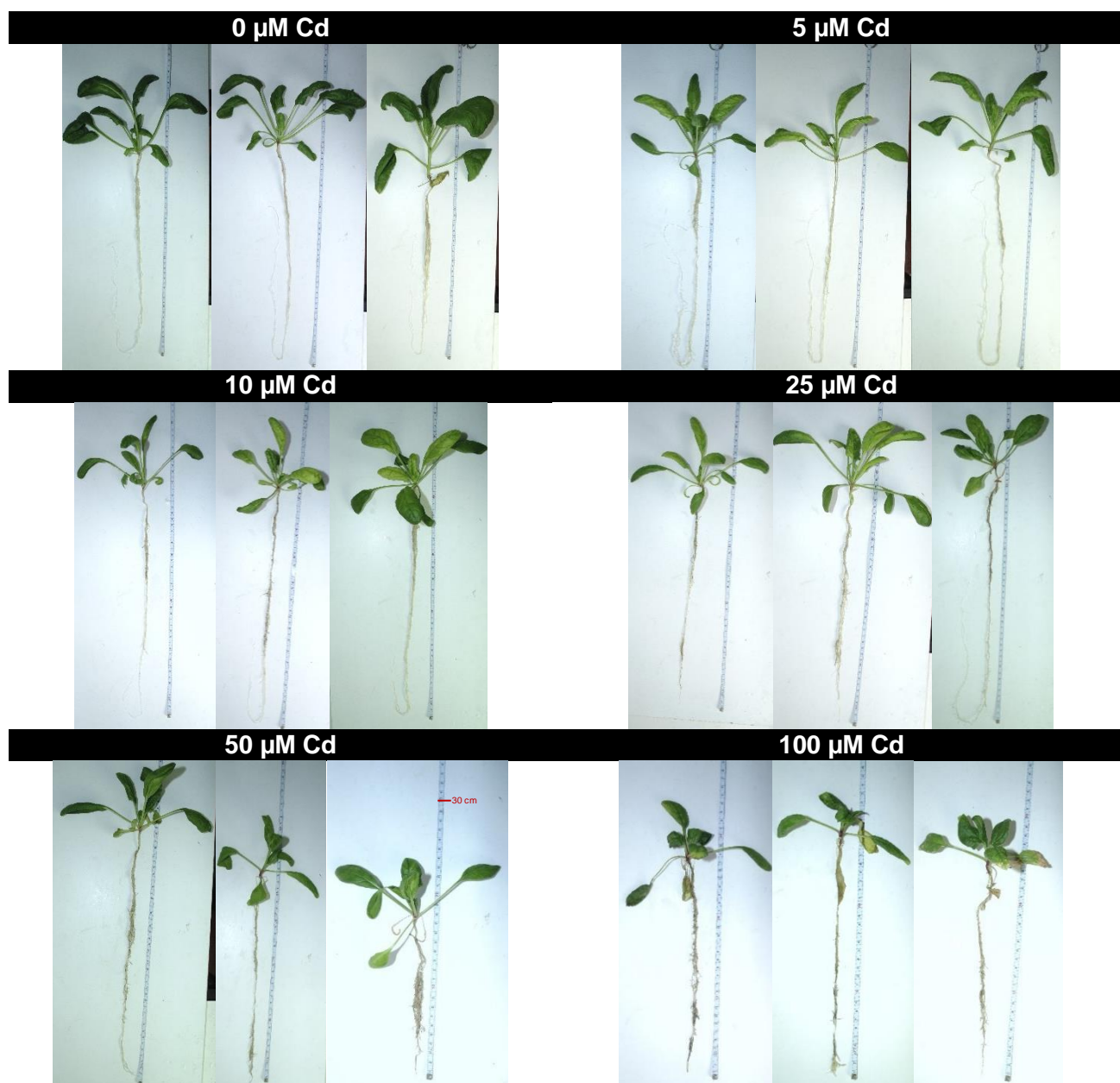


Figura A3 - Imagens do ensaio do capítulo IV, plantas adultas ao 6º dia de exposição (régua ≈ 50 cm).

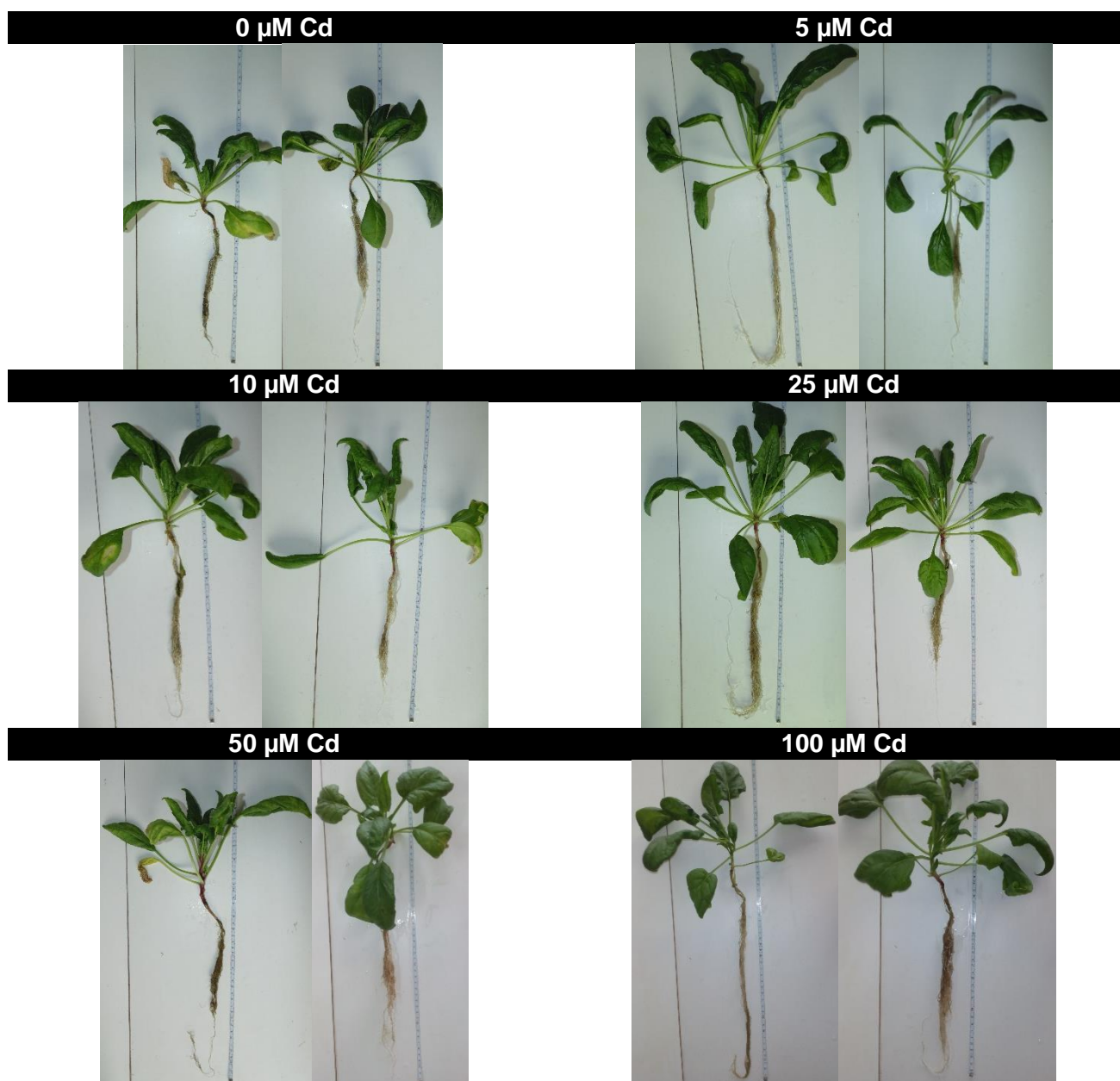


Figura A4 - Imagens do ensaio do capítulo IV, plantas adultas ao 21º dia de exposição (régua ≈ 50 cm).

